

## PATENT COOPERATION TREATY

26. OKT. 2001

PCT

**NOTIFICATION OF TRANSMITTAL  
OF COPIES OF TRANSLATION  
OF THE INTERNATIONAL PRELIMINARY  
EXAMINATION REPORT**

(PCT Rule 72.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

WEICKMANN, H.  
Kopernikusstrasse 9  
D-81679 München  
ALLEMAGNE

Date of mailing (day/month/year) 12 October 2001 (12.10.01)	<b>IMPORTANT NOTIFICATION</b>
Applicant's or agent's file reference 19116P WO	
International application No. PCT/EP00/03347	International filing date (day/month/year) 13 April 2000 (13.04.00)
Applicant WILEX BIOTECHNOLOGY GMBH et al	

**1. Transmittal of the translation to the applicant.**

The International Bureau transmits herewith a copy of the English translation made by the International Bureau of the international preliminary examination report established by the International Preliminary Examining Authority.

**2. Transmittal of the copy of the translation to the elected Offices.**

The International Bureau notifies the applicant that copies of that translation have been transmitted to the following elected Offices requiring such translation:

AU,CA,CN,JP,KP,KR,NZ,PL,US

The following elected Offices, having waived the requirement for such a transmittal at this time, will receive copies of that translation from the International Bureau only upon their request:

AP,EA,EP,AE,AG,AL,AM,AT,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,CH,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,KE,KG,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,NQ,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,UZ,VN,YU,ZA,ZW,OA

**3. Reminder regarding translation into (one of) the official language(s) of the elected Office(s).**

The applicant is reminded that, where a translation of the international application must be furnished to an elected Office, that translation must contain a translation of any annexes to the international preliminary examination report.

It is the applicant's responsibility to prepare and furnish such translation directly to each elected Office concerned (Rule 74.1). See Volume II of the PCT Applicant's Guide for further details.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Genève 20, Switzerland  Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Authorized officer  Charlotte ENGER  Telephone No. (41-22) 338.83.38
--	--

Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

10

Applicant's or agent's file reference 19116P WO	<b>FOR FURTHER ACTION</b> See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/EP00/03347	International filing date (day/month/year) 13 April 2000 (13.04.00)	Priority date (day/month/year) 13 April 1999 (13.04.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC G01N 33/574		
Applicant WILEX BIOTECHNOLOGY GMBH		

<p>1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.</p> <p>2. This REPORT consists of a total of <u>8</u> sheets, including this cover sheet.</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).</p> <p>These annexes consist of a total of <u>5</u> sheets.</p>	
<p>3. This report contains indications relating to the following items:</p> <p>I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report</p> <p>II <input type="checkbox"/> Priority</p> <p>III <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability</p> <p>IV <input checked="" type="checkbox"/> Lack of unity of invention</p> <p>V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement</p> <p>VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited</p> <p>VII <input checked="" type="checkbox"/> Certain defects in the international application</p> <p>VIII <input checked="" type="checkbox"/> Certain observations on the international application</p>	

Date of submission of the demand 20 September 2000 (20.09.00)	Date of completion of this report 08 June 2001 (08.06.2001)
Name and mailing address of the IPEA/EP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP00/03347

## I. Basis of the report

### 1. With regard to the elements of the international application:\*

- ☐ the international application as originally filed
- ☒ the description:  
 pages 1-21, as originally filed  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☒ the claims:  
 pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
 pages \_\_\_\_\_, as amended (together with any statement under Article 19  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
 pages 1-23, filed with the letter of 23 May 2001 (23.05.2001)
- ☒ the drawings:  
 pages 1/12-12/12, as originally filed  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☒ the sequence listing part of the description:  
 pages 1-4, as originally filed  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_

### 2. With regard to the language, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item. These elements were available or furnished to this Authority in the following language \_\_\_\_\_ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

### 3. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☒ contained in the international application in written form.
- ☒ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

### 4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages \_\_\_\_\_
- ☐ the claims, Nos. \_\_\_\_\_
- ☐ the drawings, sheets/fig \_\_\_\_\_

### 5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).\*\*

\* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

\*\* Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP00/03347

## IV. Lack of unity of invention

1. In response to the invitation to restrict or pay additional fees the applicant has:

- ☐ restricted the claims.
- ☒ paid additional fees.
- ☐ paid additional fees under protest.
- ☐ neither restricted nor paid additional fees.

2. ☐ This Authority found that the requirement of unity of invention is not complied with and chose, according to Rule 68.1, not to invite the applicant to restrict or pay additional fees.

3. This Authority considers that the requirement of unity of invention in accordance with Rules 13.1, 13.2 and 13.3 is

- ☐ complied with.
- ☒ not complied with for the following reasons:

See supplemental sheet.

4. Consequently, the following parts of the international application were the subject of international preliminary examination in establishing this report:

- ☒ all parts.
- ☐ the parts relating to claims Nos. \_\_\_\_\_

**INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT**

International application No.

PCT/EP 00/03347

**Supplemental Box**

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: IV.3

The examination department endorses the objection registered by the search department with respect to lack of unity of invention (PCT Rule 13.1). The different inventions are:

1. Claims 1-12, 17

Process for detecting cells in a biological sample using two different binding molecules that recognize the cells to be detected, wherein each of the binding molecules is labelled with a different fluorescent dye.

2. Claims 13-16, 18-23

Antibody or fragment thereof directed against epitope 52-60 of the urokinase receptor (uPAR).

# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.  
PCT/EP 00/03347

## V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability: citations and explanations supporting such statement

### 1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-12, 15, 17, 19-23	YES
	Claims	13, 14, 16, 18	NO
Inventive step (IS)	Claims	1-10, 17, 19-23	YES
	Claims	11-16, 18	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-23	YES
	Claims		NO

### 2. Citations and explanations

This report makes reference to the following documents:

D1: XUE *et al.*, CANCER RESEARCH, vol. 57, no. 9, 1 May 1997, pages 1682-1689

D2: EP-A-0 317 156 (BECTON DICKINSON CO), 24 May 1989

D3: LUTHER *et al.*, AMERICAN JOURNAL OF PATHOLOGY, vol. 150, no. 4, April 1997, pages 1231-1244

D4: ALLGAYER *et al.*, JOURNAL OF HISTOCHEMISTRY AND CYTOCHEMISTRY, vol. 45, no. 2, February 1997, pages 203-212

D5: HEISS *et al.*, NATURE MEDICINE, vol. 1, no. 10, October 1995 (1995-10), pages 1035-1039

#### 1. Invention 1: Claims 1-12, 17

1.1 The subject matter of Claims 1-10 and 17 is novel and involves an inventive step (PCT Article 33(2) and (3)).

D4 (abstract) and D5 (page 1039, column 1, lines 18-39), which are considered the closest prior art, disclose a process for detecting disseminated tumour

cells in bone marrow by a double staining method using a first cytokeratin-specific binding molecule and a second urokinase receptor-specific binding molecule. The subject matter of Claim 1 differs therefrom in that cells are detected using a double fluorescence method. The problem addressed by the present invention may therefore be seen to consist in providing a process for the quantitative detection of disseminated tumour cells in a biological sample that is both simple and sensitive.

D1 (page 1683, column 1, paragraphs "Indirect Immunofluorescence Staining for Microscopy" and "Fluorescence Microscopy and Data Quantitation") discloses a double fluorescence method for detecting tumour cells **in a sample completely consisting of tumour cells**. A person skilled in the art would not consider D1 since double fluorescence labelling is not known to be sufficiently sensitive for the quantitative detection of **disseminated cells**.

D2 (column 2, line 40 - column 3, line 20; column 4, lines 17-18) describes the detection of white blood cells in bone marrow and blood samples using a double fluorescence protocol. However, D2 pertains to the detection of a different cell type using different labels and a person skilled in the art would therefore not consider D2.

Therefore, the subject matter of Claim 1 involves an inventive step, as, likewise, does that of Claims 2-10 and 17.

- 1.2 The subject matter of Claims 11 does not involve an inventive step (PCT Article 33(3)).

D1 (page 1683, column 1, paragraphs "Indirect Immunofluorescence Staining for Microscopy" and "Fluorescence Microscopy and Data Quantitation") describes a process for labelling tumour cells using a double fluorescence protocol, wherein one of the binding molecules is urokinase receptor-specific. D1 also mentions an agent (3% paraformaldehyde) for fixing cells on a solid phase.

It is an obvious step for a person skilled in the art to provide the reagents required for a process in the form of a reagent kit and the subject matter of Claim 11 therefore does not involve an inventive step. This also applies to Claim 12.

**2. Invention 2: Claims 13-16, 18-23**

2.1 The subject matter of Claims 13, 14, 16 and 18 is not novel (PCT Article 33(2)).

D3 (abstract; page 1232, column 2, lines 7-10; page 1233, column 2, paragraph "ELISA"; page 1241, column 2, lines 14-47) discloses MAb IIIF10, which is directed against epitope 52-60 of uPAR, and the use of this antibody as a diagnostic tool (for prognosis of the course of malignant diseases and the detection of tumour cells in biological samples) or a therapeutic tool for the purpose of function blocking in tumour cells. D3 is therefore prejudicial to the novelty of the subject matter of Claims 13, 14, 16 and 18.

2.2 The subject matter of Claim 15 does not involve an inventive step (PCT Article 33(3)).



D4 (abstract), which is considered the closest prior art, discloses the use of an antibody directed against uPAR as a diagnostic tool for detecting tumour cells in bone marrow. The subject matter of Claim 15 differs therefrom in that a urokinase receptor-specific antibody directed against epitope 52-60 of the urokinase receptor is used.

However, use of MAb IIIF10, which is directed against epitope 52-60 of uPAR, for the same purpose has already been described in D3 (abstract; page 1232, column 2, lines 7-10). A person skilled in the art would consider D3. Therefore, the subject matter of Claim 15 does not involve an inventive step.

- 2.3 The subject matter of Claims 19-23 is novel and involves an inventive step (PCT Article 33(2) and (3)), since the prior art neither discloses nor suggests such recombinant nucleic acids (Claim 19) and recombinant polypeptides (Claim 20-23) having antibody properties.

**INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT**

International application No.

PCT/EP 00/03347

**VII. Certain defects in the international application**

The following defects in the form or contents of the international application have been noted:

Contrary to PCT Rule 5.1(a)(ii), the description does not cite D1 or indicate the relevant prior art disclosed therein.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP 00/03347

VIII. Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

The expression "**Mikrometasen**" ("**micrometases**") used in Claim 13 is vague and unclear and leaves the reader uncertain as to the meaning of the relevant technical feature. Consequently, the definition of the subject matter of this claim is unclear (PCT Article 6).

PCT

ORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales Büro

Patentanwalt

 INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
 INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation <sup>7</sup> : G01N 33/574, 33/577, 33/68, A61K 39/395, 47/48, 51/10, C12N 15/13, C07K 16/28, 19/00	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/62071  (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 19. Oktober 2000 (19.10.00)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/03347  (22) Internationales Anmeldedatum: 13. April 2000 (13.04.00)  (30) Prioritätsdaten: 99107199.4 13. April 1999 (13.04.99) EP  (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): WILEX BIOTECHNOLOGY GMBH [DE/DE]; Grillparzerstrasse 10B, D-81675 München (DE).  (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): SCHMITT, Man- fred [DE/DE]; Hohenaschauer Strasse 10, D-81669 München (DE). NOACK, Frank [DE/DE]; Willex Biotech- nology, Grillparzerstrasse 10B, D-81675 München (DE). MAGDOLEN, Viktor [US/DE]; Moosachweg 3, D-85551 Kirchheim (DE). GRAEFF, Henner [DE/DE]; Josef-Schwarz-Weg 11, D-81479 München (DE). LUTHER, Thomas [DE/DE]; Institut für Pathologie, Technische Universität Dresden, D-01307 Dresden (DE). ALBRECHT, Sybille [DE/DE]; Institut für Pathologie, Technische Universität Dresden, D-01307 Dresden (DE). MÜLLER, Martin [DE/DE]; Institut für Pathologie, Technische Universität Dresden, D-01307 Dresden	(DE). WILHELM, Olaf [DE/DE]; Grillparzerstrasse 10B, D-81675 München (DE).  (74) Anwälte: WEICKMANN, H. usw.; Kopernikusstrasse 9, D-81679 München (DE).  (81) Bestimmungsstaaten: AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).  Veröffentlicht Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.	
(54) Title: DIAGNOSTIC AND THERAPEUTIC USE OF ANTIBODIES AGAINST THE UROKINASE RECEPTOR  (54) Bezeichnung: DIAGNOSTISCHER UND THERAPEUTISCHER EINSATZ VON ANTIKÖRPERN GEGEN DEN UROKI- NASE-REZEPTOR  (57) Abstract  The invention relates to a method and to a reagent kit for detecting cells in a biological sample while using a double fluorescence technique, as well as to the diagnostic and therapeutic use of amino acid sequence-specific antibodies against the urokinase receptor exhibiting a high affinity to tumor cell-expressed receptors.  (57) Zusammenfassung  Die Erfindung betrifft ein Verfahren und einen Reagenzienkit zum Nachweis von Zellen in einer biologischen Probe unter Verwendung einer Doppelfluoreszenztechnik sowie den diagnostischen und therapeutischen Einsatz Aminosäuresequenz-spezifischer Antikörper gegen den Urokinaserezeptor mit hoher Affinität für Tumorzell-exprimierten Rezeptor.		

## Diagnostischer und therapeutischer Einsatz von Antikörpern gegen den Urokinase-Rezeptor

5

### Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren und einen Reagenzienkit zum Nachweis von Zellen in einer biologischen Probe unter Verwendung einer Doppelfluoreszenztechnik.

10

Der zuverlässige Nachweis von verstreuten Tumorzellen, die aus dem soliden Gewebeverband ausgebrochen sind (Mikrometastasen), ist für die Tumordiagnostik und Therapie von großer Bedeutung. Im Laufe der vergangenen Jahre wurden deshalb verschiedene Verfahren entwickelt, um solche einzelnen verstreuten Tumorzellen in Körperflüssigkeiten oder Gewebeproben nachzuweisen. Der Nachweis kann z.B. durch selektive Markierung der seltenen Zellen mittels immunzytochemischer Methoden erfolgen, wobei häufig enzymatische Markierungsgruppen wie Alkalische Phosphatase eingesetzt werden. Auch Doppelmarkierungstechniken sind bekannt.

20

Die Veröffentlichung Schlimok et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84 (1987) 8672-8676) beschreibt den Nachweis von mikrometastatischen Tumorzellen in Knochenmark mittels einer Doppelmarkierungstechnik, wobei ein für Zellen epidermalen Ursprungs spezifischer Cytokeratin 18-Antikörper und ein Leukozyten-Antikörper verwendet werden. Dabei werden Alkalische Phosphatase und eine radioaktive Markierungsgruppe ( $^{125}\text{I}$ ) eingesetzt. Da die Verwendung radioaktiver Markierungsgruppen mit Nachteilen behaftet ist, eignet sich diese Methode nicht für die klinische Praxis.

30

Funke et al. (Int. J. Cancer 65 (1996), 755-761) beschreiben den Nachweis von Mikrometastasen in Knochenmark mittels einer Doppelmarkierungs-

- 2 -

technik unter Verwendung eines Cytokeratin 18-Antikörpers und eines E-Cadherin-Antikörpers. Beide Antikörper werden über Alkalische Phosphatase als enzymatische Markierungsgruppe und zwei unterschiedlich gefärbte chromogene Substrate nachgewiesen. Der sequenzielle Nachweis beider Antikörper mittels unterschiedlicher chromogener Substrate ist jedoch umständlich und deshalb für die klinische Praxis wenig geeignet.

Heiss und Mitarbeiter (Heiss et al., Nature Med. 1 (1995), 1035-1039 und Allgayer et al., J. Histochem. Cytochem. 45 (1997), 203-212) weisen verstreute Tumorzellen in Knochenmark über eine Doppelmarkierungsmethode basierend auf dem gleichzeitigen Nachweis von Cytokeratin 18 und dem uPA-Rezeptor (uPAR) nach. Hierzu werden auf einem Objektträger gebundene, fixierte Zellen mit einem biotinylierten Cytokeratin-spezifischen Antikörper und anschließend mit einem Konjugat aus Alkalischer Phosphatase und Streptavidin inkubiert. Mittels der immobilisierten Alkalischen Phosphatase und einem chromogenen Substrat wird eine enzymatische Färbereaktion durchgeführt, wobei eine dunkelrote Färbung entsteht. Zusätzlich wird ein monoklonaler Antikörper gegen uPAR eingesetzt, der mit einem goldkonjugierten Sekundärantikörper markiert und anschließend einer Silber-Verstärkungsreaktion unterzogen wird, wobei eine schwarze Färbung resultiert. Die Objektträger werden dann auf die Färbungen (dunkelrot/schwarz) manuell und visuell unter dem Mikroskop durchgemustert, wobei eine Doppelfärbung extrem schwer zu detektieren ist.

Die der vorliegenden Erfindung zugrundeliegende Aufgabe bestand darin, ein Verfahren zum Nachweis von Zellen, insbesondere von selten vorkommenden Zellen wie Tumorzellen in einer biologischen Probe, z.B. Knochenmark, durchzuführen, bei dem die Nachteile des Standes der Technik mindestens teilweise beseitigt sind. Insbesondere soll das Verfahren gleichzeitig eine hohe Sensitivität und eine problemlose Auswertbarkeit ermöglichen.

Diese Aufgabe wird gelöst durch ein Verfahren zum Nachweis von Zellen in einer biologischen Probe, das folgende Schritte umfaßt:

- (a) Bereitstellen einer zu testenden Probe,
- (b) Inkontaktbringen der Probe mit mindestens zwei verschiedenen, die nachzuweisenden Zellen erkennenden Bindemolekülen, wobei die Bindemoleküle mit jeweils verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert werden, und
- (c) Bestimmen der Fluoreszenzmarkierungen in der auf einer Festphase fixierten Probe.

Das erfindungsgemäße Verfahren eignet sich zum Nachweis selten vorkommender Zellen in einer fixierten biologischen Probe. "Selten vorkommend" im Sinne der vorliegenden Erfindung bedeutet dabei, daß die erwartete Häufigkeit der nachzuweisenden Zellen im Bereich von  $1:10^4$  bis  $1:10^7$  der gesamten in der zu testenden Probe vorhandenen Zellen ist. Beispiele für solche selten vorkommenden Zellen sind Tumorzellen in einer Blut- oder Knochenmarksprobe. Bei entsprechender Auswahl von zell-spezifischen Determinanten und dagegen gerichteten Bindemolekülen können selbstverständlich auch andere Arten selten vorkommender Zellen nachgewiesen werden.

Das erfindungsgemäße Verfahren ermöglicht aufgrund der Doppelfluoreszenz-Färbetechnik eine schnelle und genaue Identifizierung der nachzuweisenden Zellen. Außerdem können bei Verwendung unterschiedlicher, vorzugsweise nebeneinander nachweisbarer Fluoreszenzmarkierungen in sowie auf der Zelle kolokalisierte Antigene (wie z.B. Cytokeratin 8/18, p53, PAI-2 und insbesondere der Urokinase-Rezeptor uPAR) analysiert werden. Dies ist bisher mit bekannten Methoden insbesondere bei Gewebeproben wie Knochenmarksaspiraten sehr schwierig gewesen. Ein weiterer großer Vorteil der neu entwickelten Methode ist die Möglichkeit, die Anzahl und Intensität fluoreszierender Zellen quantitativ zu bestimmen, beispielsweise mit einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop.

Schritt (a) des erfindungsgemäßen Verfahrens umfaßt das Bereitstellen einer zu testenden biologischen Probe. Hierzu wird eine Probe dem Patienten, z.B. aus einer Körperflüssigkeit wie etwa Blut oder aus einem Gewebe wie etwa Knochenmark entnommen. Besonders bevorzugt wird das erfindungsgemäße  
5 Verfahren zum Nachweis verstreuter Tumorzellen epidermalen Ursprungs im Knochenmark verwendet. Dabei kann das Knochenmark aus dem Beckenkammknochen entnommen werden. In der Probe werden dann vorzugsweise mononukleäre Zellen einschließlich Tumorzellen angereichert. Diese Anreicherung kann nach bekannten Methoden beispielsweise durch  
10 Dichtegradienten-Zentrifugation, z.B. Ficoll, erfolgen, wobei eine Abtrennung von Erythrozyten und Granulozyten stattfindet.

Die zu testende Probe enthält vorzugsweise mindestens  $10^6$  Zellen, um einen zuverlässigen Nachweis seltener Zellen zu ermöglichen. Besonders  
15 bevorzugt enthält die Probe  $10^6$  bis  $10^9$ , insbesondere  $5 \times 10^6$  bis  $5 \times 10^7$  Zellen.

Gemäß Schritt (b) wird die Probe mit mindestens zwei verschiedenen, gegen die nachzuweisenden Zellen gerichteten Bindemolekülen in Kontakt  
20 gebracht. Die Bindemoleküle sind vorzugsweise Antikörper oder Antikörperfragmente, insbesondere monoklonale Antikörper oder Antikörperfragmente. Darüber hinaus können jedoch auch Liganden von in den nachzuweisenden Zellen spezifisch vorhandenen Rezeptoren, z.B. dem uPA-Rezeptor, verwendet werden. Beispiele solcher Liganden sind lineare oder/und  
25 zyklische Peptide oder Peptidmimetika, die eine Fluoreszenzmarkierung tragen können.

Das Inkontaktbringen der Probe mit den fluoreszenzmarkierten Bindemolekülen erfolgt vorzugsweise nach Fixierung der Zellen auf eine Festphase. Diese  
30 Fixierung kann nach bekannten Methoden, z.B. mit Formaldehyd oder Glutardialdehyd, erfolgen. Als Festphase kann beispielsweise ein Objektträger verwendet werden.



Sofern erforderlich, können die in der zu testenden Probe vorliegende Zellen unter Verwendung eines Detergens, z.B. eines Saponins, permeabilisiert werden. Auf diese Weise können die Bindemoleküle auch an intrazellulär lokalisierte Determinanten binden.

5

Beim Nachweis von Tumorzellen sind die Bindemoleküle gegen Determinanten gerichtet, die in der zu testenden Probe nur oder in erhöhter Konzentration in Tumorzellen, aber nicht oder nur in geringer Konzentration in normalen Zellen vorkommen. Vorzugsweise wird als erste Determinante eine Struktur aus dem Inneren der Zellen, z.B. ein Cytokeratin, ausgewählt. Cytokeratine sind für Epithelzellen spezifische Bestandteile des Cytoskeletts und werden in mononukleären Blut- oder Knochenmarkszellen, die mesenchymalen Ursprungs sind, nicht exprimiert. Die Anwesenheit von Cytokeratinen in Zellen, die aus Blut- und Knochenmark entnommen wurden, weist somit auf das Vorhandensein epithelialer Tumorzellen hin. Beispiele für geeignete Anti-Cytokeratin-Antikörper sind der Antikörper A45B/B3 (Micromet GmbH, München, Deutschland) oder der Antikörper CK2 (Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Deutschland). Weitere gegen intrazelluläre tumorassoziierte Antigene gerichteten Nachweisantikörper sind bekannt und kommerziell von verschiedenen Firmen erhältlich.

20

Als zweite Determinante wird vorzugsweise eine Struktur auf der Zelloberfläche ausgewählt, z.B. ein membranständiger Rezeptor. Eine besonders bevorzugte tumorspezifische Determinante ist der Urokinaserezeptor (uPAR). Der Nachweis dieses Rezeptors kann beispielsweise unter Verwendung von Anti-uPAR-Antikörpern wie etwa IID7 und IIIF10 (Luther et al., Am. J. Path. 150 (1997), 1231-1244) erfolgen. Vorzugsweise werden solche Anti-uPAR-Antikörper ausgewählt, die eine mindestens vergleichbare Affinität für einen Tumorzellen-spezifischen uPAR aufweisen, wie für einen uPAR aus "normalen" Zellen. Beispiele für solche auch Tumorzellen mit hoher Affinität bindende Anti-uPAR-Antikörper sind Antikörper, die das Epitop 52-60 von uPAR erkennen wie etwa der bereits oben genannte Antikörper IIIF10.

30

Andere Anti-uPAR-Antikörper erkennen hingegen uPAR auf Tumorzellen oftmals nur schlecht.

5 Andererseits kann der Nachweis von uPAR auch mit Fluoreszenz-markierten Rezeptorliganden, z.B. Urokinase, Urokinasefragmenten oder Urokinase-Peptiden erfolgen. Derartige Nachweismethoden sind beispielsweise von Chucholowski et al. (Fibrinolysis 6, Suppl. 4 (1992), 95-102), Ciccocioppo et al. (J. Histochem. Cytochem. 45 (1997), 1307-1313) und Luther et al. (Am. J. Pat. 150 (1997), 1231-1242) beschrieben.

10 Im erfindungsgemäßen Verfahren werden mindestens zwei verschiedene Fluoreszenzmarkierungsgruppen verwendet. Günstigerweise werden solche Fluoreszenzmarkierungsgruppen eingesetzt, die voneinander unterscheidbare Emissionsspektren besitzen (z.B. rot/grün). Beispiele für geeignete  
15 Fluoreszenzfarbstoffe sind Fluorescein und Derivate davon, Phycoerythrin, Rhodamin, TRITC-Amine, Texas Red®-Amine, CY3 und CY5 sowie Alexa® 488 und Alexa® 568 (Molecular Probes). Die Fluoreszenzfarbstoffe können direkt, z.B. kovalent, mit den primären, für die nachzuweisende Zellen spezifischen Bindemolekülen konjugiert werden. In diesem Fall spricht man  
20 von einer Direktmarkierung. Andererseits können die Fluoreszenzfarbstoffe an sekundäre Bindemoleküle konjugiert werden, welche ihrerseits gegen die primären Bindemoleküle gerichtet sind. In diesem Fall spricht man von einer Indirektmarkierung. Beide Markierungsmethoden, bzw. Kombinationen davon können beim erfindungsgemäßen Verfahren verwendet werden.

25 Die verschiedenen Bindemoleküle können mit der Zelle sequenziell oder parallel inkubiert werden. Eine parallele Inkubation mit mehreren Bindemolekülen (primäre Bindemoleküle und gegebenenfalls sekundäre Bindemoleküle bei Indirektmarkierung) führt zu einer erheblichen Zeitersparnis.

30 Die Auswertung der Probe erfolgt durch Bestimmung der Fluoreszenz nach Anregung der Fluoreszenzmarkierungsgruppen. Besonders bevorzugt wird

hierfür ein konfokales Laser-Scanning-Mikroskop oder ein Fluoreszenzmikroskop verwendet, welches eine Auswertung der Probe durch parallele oder/und sequenzielle Bestimmung der verschiedenen Fluoreszenzmarkierungsgruppen ermöglicht.

5

Die erfindungsgemäße Doppelfluoreszenz-Markierungstechnik ermöglicht darüber hinaus eine Charakterisierung der durch Reaktion mit den Bindemolekülen als positiv identifizierten Zellen. Diese Charakterisierung kann eine ortsspezifische oder/und quantitative Auswertung der Markierung umfassen. So kann ein "Scannen" von einzelnen Zellen durch Bestimmung der Markierung in mehreren, z.B. 10 bis 50, Schnittebenen durch die Zelle in Abständen von beispielsweise 0,1 bis 1  $\mu\text{m}$  erfolgen. Zusätzlich kann anhand einer Standardkurve, die durch die Messung von Mikropartikeln definierter Größe und definierter Menge an Fluoreszenzfarbstoff erstellt wurde, auch eine quantitative Bestimmung der mit den Bindemolekülen reagierenden Determinanten in der Zelle durchgeführt werden.

10

15

Das erfindungsgemäße Verfahren erlaubt die Gewinnung wertvoller diagnostischer Daten an Tumorpatienten und ermöglicht daher eine sensitive Prognosestellung für den Patienten nach Operation eines Primärtumors.

20

Schließlich betrifft die Erfindung einen Reagenzienkit zum Nachweis von Zellen in einer biologischen Probe umfassend

25

- (a) ein erstes, die nachzuweisenden Zellen erkennendes Bindemolekül und eine erste Fluoreszenz-Markierungsgruppe,
- (b) ein zweites, die nachzuweisenden Zellen erkennendes Bindemolekül und eine zweite Fluoreszenz-Markierungsgruppe, wobei das erste und das zweite Bindemolekül und die erste und die zweite Fluoreszenz-Markierungsgruppe verschieden sind und
- (c) Mittel zur Fixierung von Zellen auf einer Festphase.

30

Überraschenderweise wurde festgestellt, daß uPAR-Antikörper, die gegen das Epitop 52-60 von uPAR gerichtet sind, einen uPAR mit einer in Tumorzellen vorkommenden Glykostruktur erkennen, d.h. mit mindestens vergleichbarer Affinität an einen von Tumorzellen exprimierten uPAR wie an einen von Normalzellen exprimierten uPAR binden. Andere Anti-uPAR-Antikörper z.B. HD13.1 (Todd et al., CD87 workshop panel report. In: Kishimoto T. et. al., Hrsg., Leucocyte Typing VI, New York & London, Garland Publishing, Inc. 1997; 1016-1020) besitzen hingegen nur eine geringe Affinität für uPAR aus Tumorzellen.

Die Erfindung betrifft somit die Verwendung eines Antikörpers oder eines antigenbindenden Fragments davon (vorzugsweise eines monoklonalen Antikörpers oder eines antigenbindenden Fragments davon), der gegen das Epitop 52 bis 60 von uPAR gerichtet ist, zur Herstellung eines gegen uPAR auf Tumorzellen gerichteten diagnostischen oder therapeutischen Mittels. Derartige Antikörper wie etwa der bekannte monoklonale Antikörper IIIF10 (Luther et. al. (1997), supra) oder Antikörper mit äquivalenter Bindspezifität, wie etwa chimärisierte oder humanisierte Antikörper oder entsprechende rekombinante oder proteolytische Antikörperfragmente, z.B. einzelkettige Antikörper-Fragmente, erkennen einen von Tumorzellen exprimierten uPAR mit einer für diagnostische und therapeutische Zwecke ausreichenden Affinität.

Weiterhin wurde überraschend festgestellt, daß derartige Antikörper oder Fragmente davon als diagnostisches Mittel zur Prognose des Verlaufs bei malignen Erkrankungen, insbesondere bei Tumoren, z.B. Mammakarzinomen, eingesetzt werden können. In Tumorproben von über 200 untersuchten Mamakarzinompatientinnen wurde gefunden, daß die Bindung des Antikörpers IIIF10 oder eines entsprechenden Antikörpers mit äquivalenter Bindefähigkeit eine signifikante prognostische Relevanz für den Krankheitsverlauf, d.h. Rezidivfreiheit bzw. Versterben aufweist. Dabei bedeuten hohe Antigenwerte eine kürzere Rezidivfreiheit bzw. früheres Versterben. Mit

Antikörpern, die gegen andere Regionen von uPAR gerichtet sind, konnte eine derartige prognostische Signifikanz nicht gefunden werden.

Aufgrund der hohen Affinität zu Tumor-uPAR eignen sich diese Antikörper oder Fragmente davon auch als diagnostische Mittel zum Nachweis von Tumorzellen in einer biologischen Proben, insbesondere zum Nachweis von verstreuten Tumorzellen in Knochenmark. Derartige Nachweisverfahren können beispielsweise als ELISA oder als - zuvor im Detail erläutertes - Doppelfluoreszenz-Nachweisverfahren durchgeführt werden.

Darüberhinaus sind Antikörper, die gegen das Epitop 52 bis 60 von uPAR gerichtet sind, oder deren Fragmente zur Herstellung eines therapeutischen Mittels geeignet, welches beispielsweise eine selektive Funktionsblockierung bei Tumorzellen bewirken kann. Darüberhinaus können die Antikörper oder deren Fragmente in Form von Konjugaten mit einer cytotoxischen Gruppe zur Wachstumshemmung oder Abtötung von Tumorzellen eingesetzt werden. Beispiele für geeignete cytotoxische Gruppen sind radioaktive Gruppen, Toxine und Zellwachstumsinhibitoren. Für therapeutische Zwecke werden vorzugsweise chimäre Antikörper mit humanisierten konstanten Domänen eingesetzt, deren Herstellung beispielsweise in EP-B-O 120 694 beschrieben ist.

Noch ein weiterer Gegenstand der Erfindung sind rekombinante Nukleinsäuren, die für ein Polypeptid mit Antikörpereigenschaften kodieren und die CDR3-VH-Sequenz oder/und die CDR3-VL-Sequenz des Antikörpers III F10 umfassen. Die CDR3-Region der VH-cDNA ist in SEQ ID NO. 1/2 von Nukleotid 295 bis 321 (entsprechend Aminosäure 99 bis 107) dargestellt. Die CDR3-Region der VL-cDNA ist in SEQ ID NO. 3/4 von Nukleotid 265 bis 291 (Aminosäure 89 bis 97) dargestellt. Weiterhin enthalten die Nukleinsäuren vorzugsweise die für die CDR1- und/oder CDR2-Regionen kodierenden Abschnitte der VH- oder/und VL-cDNA. Die Sequenzen für die CDR1-VH-Region sind in SEQ ID NO. 1/2 von Nukleotid 91 bis 105

(entsprechend Aminosäure 31 bis 35, d.h. SYDIN) angegeben. In SEQ ID NO. 3/4 reicht die CDR1-Region der VL-cDNA von Nukleotid 70 bis 102 (entsprechend Aminosäure 24 bis 34, d.h. KAS...TVA). Die CDR2-Region der VH-cDNA reicht von Nukleotid 148 bis 198 (Aminosäure 50 bis 66, d.h. WIF...FKD) in SEQ ID NO. 1/2. Die CDR2-Region der VL-cDNA reicht von Nukleotid 148 bis 168 (entsprechend Aminosäure 50 bis 56, d.h. LASNRHT) in SEQ ID NO. 3/4.

Die Erfindung betrifft somit insbesondere rekombinante Nukleinsäuren, die für ein Polypeptid mit Antikörpereigenschaften kodieren, umfassend

(a) eine CDR3-VH-Sequenz kodierend für die Aminosäuresequenz (I):

D G S M G G F D Y

oder/und

(b) eine CDR-3-VL-Sequenz kodierend für die Aminosäuresequenz (II):

L Q H W N Y P Y T

Weiterhin betrifft die Erfindung rekombinante Polypeptide mit Antikörpereigenschaften umfassend

(a) eine CDR3-VH-Aminosäuresequenz (I):

D G S M G G F D Y

oder/und

(b) eine CDR-3-VL-Aminosäuresequenz (II):

L Q H W N Y P Y T

Die rekombinanten Nukleinsäuren und Polypeptide enthalten vorzugsweise die CDR3-Regionen sowohl der VH- als auch der VL-Sequenz. Besonders bevorzugt sind die rekombinanten Polypeptide einzelkettige Antikörper, z.B. scFv-Antikörperfragmente. Bei den rekombinanten Polypeptiden sind die nicht unmittelbar für die Antigenbindung verantwortlichen Framework-Domänen vorzugsweise durch entsprechende humane Sequenzen ersetzt, so daß humanisierte Antikörperfragmente entstehen. Die erfindungs-

gemäßen rekombinanten Polypeptide können mit Effektorgruppen, d.h. cytotoxischen Gruppen für therapeutische Zwecke oder/und Nachweisgruppen für ein Tumorimaging gekoppelt sein.

- 5 Weiterhin wird die Erfindung durch die nachfolgenden Abbildungen und Beispiele erläutert. Es zeigen:

Abbildung 1: Eine schematische Darstellung des "Scannens" einer Zelle im Lasermikroskop.

- 10 a) Von einer ca. 15  $\mu\text{m}$  großen Tumorzelle werden insgesamt 30 Serienschnitte im Abstand von jeweils 0,5  $\mu\text{m}$  angelegt.
- b) Die Messung der Fluoreszenz wird in jeder Schnittebene durchgeführt und dann alle Fluoreszenzwerte addiert.
- 15 c) Anhand einer Standardkurve (Latex-Mikropartikel mit definierter Fluorochrommenge) erfolgt eine Berechnung der Gesamtfluoreszenz.

Abbildung 2: das Ergebnis der Fluoreszenzanfärbung einer Tumorzelle mit dem Anti-Cytokeratin-Antikörper A45 B/B3 und Alexa 488 als Fluoreszenzfarbstoff.

- 20 a) Die Bildsequenz zeigt 24 Aufnahmen einer Scanprozedur, bei der eine ca. 12  $\mu\text{m}$  große Mammakarzinomzelle (ZR75) in Schnittebenen von jeweils 0,5  $\mu\text{m}$  Abstand vermessen wurde.
- 25 b) Es ist eine "extended focus" Aufnahme gezeigt, bei der die Gesamtintensität des gesamten Scans (a) auf eine einzige Bildebene projiziert wurde.

30 Abbildung 3: das Ergebnis einer indirekten Fluoreszenzanfärbung mit A45B/B3 als Primärantikörper und einem mit Alexa 488 konjugierten Sekundärantikörper (Vergrößerung x63),

- a) Transmissionsbild
- b) eine Cytokeratin-positive Zelle im Knochenmarkausstrich einer Patientin mit Mammakarzinom.

5      Abbildung 4:      das Ergebnis einer direkten Fluoreszenzanfärbung mit einem Konjugat des Antikörpers A45B/B3 und dem Fluoreszenzfarbstoff Alexa 488 (Vergrößerung x63),

- a) Transmissionsbild
- b) Cytokeratinnachweis in einer Mischpräparation aus MCF7-Tumorzellen und peripheren Blutlymphozyten (1:20)

10

15      Abbildung 5:      das Ergebnis einer direkten Fluoreszenzanfärbung mit einem Konjugat des Anti uPAR-Antikörpers IIIIF10 und dem Fluoreszenzfarbstoff Alexa 568 (Vergrößerung x63),

- a) Transmissionsbild
- b) uPA-Rezeptornachweis in einer Mischpräparation aus MCF 7-Tumorzellen und peripheren Blutlymphozyten (1:20)

20

25      Abbildung 6:      das Ergebnis einer direkten Doppelfluoreszenzanfärbung mit den Konjugaten A45 B/B3-Alexa 488 (Anti-Cytokeratin) und IIIIF10-Alexa 568 (Anti-uPAR),

- a) Transmissionsbild
- b) Cytokeratinnachweis
- c) uPA-Rezeptornachweis

25

30      Abbildung 7:      das Ergebnis der Vermessung einer Tumorzelle im Knochenmark (Vergrößerung x 63),

- a) Transmissionsbild (Nomarski-Optik)



- b) Reaktion der Zelle mit einem Konjugat aus Alexa 488 und einem Anti-Cytokeratinantikörper
- c) Reaktion der Zelle mit einem Konjugat aus Alexa 568 und einem uPAR-Antikörper. Der Zellkern ist nicht gefärbt. Die Reaktion des Anti-uPAR-Antikörpers beschränkt sich hauptsächlich auf die Zellmembran. Rechts unten ist eine uPAR-positive Knochenmarkszelle, welche negativ für Cytokeratin ist, dargestellt. Alle anderen Zellen sind uPAR-negativ.

Abbildung 8: den Einfluß von uPA auf die uPAR Bestimmung

- a) das UPA/uPAR-Verhältnis in Tumorextrakten von 599 Mammakarzinompatientinnen,
- b) die Bestimmung von uPAR in Gegenwart unterschiedlicher uPA-Mengen,

Abbildung 9: den uPAR-Antigengehalt in verschiedenen Zellen bestimmt durch unterschiedliche Testverfahren:

IIIF10/HU277 schwarz, HD13.1/HU277: dunkelgrau, ADI hellgrau

- a) normale Zellen
- b) gut differenzierte Tumorzellen
- c) schlecht differenzierte Tumorzellen

Abbildung 10: die prognostische Relevanz des uPAR-Antigengehalts bestimmt durch unterschiedliche Testverfahren an 203 Mammakarzinompatientinnen

- a) IIIF10/HU277
- b) HD13.1/HU277
- c) ADI

- Abbildung 11: die dosisabhängige Inhibierung des Tumorwachstums von humanem Brustkrebs in Nacktmäusen bei Verabreichung des Antikörpers IIIIF10.
- 5   Abbildung 12: die Bindung von scFv IIIIF10 an immobilisierte Antigene.
- Abbildung 13: die Hemmung der Bindung von IIIIF10 (monoklonaler Antikörper/moab und scFv) an uPAR durch Peptide.
- 10   SEQ IN NO 1/2: die Nukleotidsequenz der für die VH-Kette von IIIIF10 VH kodierenden cDNA und die korrespondierende Aminosäuresequenz.
- 15   SEQ ID NO 3/4: die Nukleotidsequenz der für die VL-Kette von IIIIF10 kodierenden cDNA und die korrespondierende Aminosäuresequenz.

## Beispiele

### 20   1. Doppelfluoreszenzbestimmung von Tumorzellen

#### 1.1   Material

Der monoklonale Maus-Antikörper A45B/B3 (Kaspar et al., Eur. J. Cancer Clin. Oncol 23, (1987), 137-147) ist gegen die Cytokeratin-Filamente 8, 18 und 19 (CK 8,18,19) gerichtet. Dieser Antikörper wurde mit dem Fluorochrom ALEXA 488 von Molecular Probes direktkonjugiert. Der uPA-Rezeptor wird vom monoklonalen Maus-Antikörper IIIIF10 (Luther et al. (1997), supra) (Epitop 52 bis 60) spezifisch detektiert. Als weitere uPA-Rezeptor-Antikörper stehen die monoklonalen Antikörper HD 13.1 und II D7 (Luther et. al. (1997), supra) (Epitop 125 bis 132), sowie der polyklonale Kaninchen-antikörper #399R (Stahl et. al., Cancer Res. 54 (1994), 3066-3071) und der

Hühnerantikörper HU277 (Magdolen et al., Electrophoresis 16 (1995), 813-816) zur Verfügung. Alle monoklonalen Antikörper gegen den uPA-Rezeptor wurden mit dem Fluoreszenzfarbstoff ALEXA® 568 direktkonjugiert.

5      Tabelle 1      Verwendete direktkonjugierte Antikörper

Monoklonaler Antikörper	Antigen	Direktkonjugiert mit	Anregungsbereich im CLSM*	Hersteller
10      mAb II D 7 (Maus)	uPAR, Domäne 2	ALEXA 568 (™Molecular Probes)	568 nm	Pathologie Dresden und Frauenklinik München
mAb III F 10 (Maus)	uPAR, Domäne 1	ALEXA 568 (™Molecular Probes)	568 nm	Pathologie Dresden und Frauenklinik München
15      mAb HD 13.1 (Maus)	uPAR, Domäne 2 + 3	ALEXA 568 (™Molecular Probes)	568 nm	Immunologie Heidelberg
mAb A45 B/B 3 (Maus)	Cytokeratin 8/9/18	ALEXA 488 (™Molecular Probes)	488 nm	Micromet München

(\*CLSM = konfokales Laser-Scanning-Mikroskop)

## 20      1.2      Knochenmarkpräparate

Im Operationssaal wird eine Jamshidi-Punktion durchgeführt. Beiderseits werden jeweils 4-6 ml Knochenmark aus den Beckenkammknochen entnommen. Die Anreicherung der Tumorzellen in der Fraktion der mononukleären Zellen erfolgt über einen Ficollgradienten. 8 bis 12 Cytospins ( $10^6$  Zellen pro Cytospin) werden pro Patient hergestellt. Nach Lufttrocknung werden die Präparate fixiert und permeabilisiert.

### 1.3 Fixierung und Permeabilisierung

1. Fixieren in 4% Paraformaldehyd (PFA) für 30 min.
2. Dreimal in Phosphat-gepufferter Salzlösung/Rinderserumalbumin (PBS/BSA) 1% waschen.
3. Permeabilisieren in 0,025% Saponin für 45 min.
4. Dreimal in PBS/BSA 1% waschen.

### 1.4 Doppelmarkierung von Cytokeratin und uPA-Rezeptor

#### 1.4.1 Indirekte Methode

1. Inkubation über Nacht mit dem Primär-Maus-Antikörper A 45 B/B3 (Endkonzentration 0,004 mg/ml) in PBS/BSA 1% verdünnt.
2. Dreimal in PBS/BSA 1% waschen.
3. Inkubation mit dem zweiten in PBS/BSA 1% verdünnten Primär-Kaninchen-Antikörper #399 R (Endkonzentration 0,05 mg/ml) für 2 Stunden.
4. Dreimal in PBS/BSA 1% waschen
5. Sekundärantikörper Ziege-Anti-Maus-Alexa 488 (Endkonzentration 0,02 mg/ml) PBS/BSA 1% verdünnt, Inkubationszeit 30 min
6. Dreimal in PBS/BSA 1% waschen
7. Sekundärantikörper Ziege-Anti-Kaninchen-Alexa 568 (Endkonzentration 0,02 mg/ml) PBS/BSA 1% verdünnt, Inkubationszeit 30 min
8. Dreimal in PBS/BSA 1% waschen
9. Eindeckeln mit 5 µl PBS/BSA 1% und mikroskopieren

#### 1.4.2 Direkte Methode

1. Inkubation für 1 Stunde mit dem Antikörper A 45 B/B3-Alexa 488 (Endkonzentration 0,0014 mg/ml) in PBS/BSA 1 % verdünnt.
- 5 2. Dreimal in PBS/BSA 1 % waschen.
3. Inkubation über 1 Stunde mit dem Antikörper III F 10-Alexa 568 (Endkonzentration 0,003 mg/ml) in PBS/BSA 1 % verdünnt.
4. Dreimal in PBS/BSA 1 % waschen.
5. Eindeckeln mit 5  $\mu$ l PBS/BSA 1 % und mikroskopieren.

#### 1.5 Quantifizierung

Die mit dem fluoreszierenden Antikörper reagierenden Antigene werden im konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop bei einem Anregungsbereich von 488 nm bzw. 568 nm sichtbar. Durch "Scannen" der Zelle im Lasermikroskop, d.h. durch Durchschichten in 0,5  $\mu$ m Schritten, werden Tumorzellen in 20 bis 30 Schnittebenen aufgeteilt. Alle Fluoreszenzen werden erfaßt, die Summe dieser Messungen wird errechnet. Anhand einer Standardkurve, die durch die Messung von Latexbeads mit einer definierten Menge an Fluoreszenzfarbstoff zuvor erstellt wurde, ist eine Quantifizierung der Antigene, die mit dem Antikörper reagiert haben, in der Tumorzelle möglich.

In Abbildung 1 ist das Prinzip der zur Lokalisierung und Quantifizierung der Fluoreszenzmarkierung verwendeten Scanning-Prozedur graphisch dargestellt. Die Abbildungen 2 bis 7 zeigen beispielhafte Ergebnisse für die praktische Anwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens.

#### 2. Tumorspezifität des monoklonalen Antikörpers IIIF10

Es wurden zwei verschiedene ELISA-Systeme für den Nachweis von uPAR-Antigen entwickelt:

- 1) Fängerantikörper: polyklonaler Hühnerantikörper HU277 (Magdolen et al. (1995), supra); Nachweisantikörper: Monoklonaler Antikörper IIIF10 (Luther et al. (1997), supra)
- 2) Fängerantikörper: polyklonaler Hühnerantikörper HU277; monoklonaler Antikörper HD13.1 (Todd et al. (1997), supra).

Diese ELISA-Systeme wurden mit einem kommerziell erhältlichen ELISA (ADI) für uPAR (American Diagnostica Inc. Greenwich, CT, USA) verglichen.

Die getesteten ELISA-Systeme wurden mit rekombinantem, in CHO-Zellen exprimierten, affinitätsgereinigten humanen uPAR (rec-uPAR) aufeinander eingestellt. Alle drei ELISA-Systeme zeigten gegenüber rec-uPAR eine vergleichbare Linearität und Sensitivität.

In fortführenden Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß der tatsächliche uPAR-Antigengehalt auf Zellen auch in Anwesenheit eines bis zu sechsfachen Überschusses von uPAR bestimmt werden kann. Die Wiederfindung war > 95% im Falle des IIIF10/HU277- und des HD13.1/HU277-Tests sowie > 80% im Falle des ADI-Tests. Das uPA/uPAR-Verhältnis in 599 analysierten Tumorextrakten ist typischerweise in 95% der Fälle < 3 (Tests mit ADI-UPA- und ADI-uPAR-ELISA). Diese Ergebnisse sind in Abbildung 8 gezeigt.

Anschließend wurden uPAR-Antigengehalte in Lysaten verschiedener Zelltypen bestimmt. Hier zeigte sich, daß die uPAR-Antigenbestimmung in nichtmalignen Zellen (z.B. Keratinozyten [HaCaT], Endothelzellen aus der Nabelschnur [HUVEC], epithelialen Zellen an der Mamma [HMEC]) vergleichbare Resultate mit allen drei ELISA-Systemen erbrachte. Bei Tumorzelllinien ergab sich hingegen ein deutlich anderes Bild. In gut differenzierten Mammakarzinomzellen erkannte lediglich der IIIF10/HU277 ELISA signifikante Mengen an Tumor-assoziiertem uPAR, während in schlecht differenzierten Mammakarzinomzelllinien der IIIF10/HU277- und der ADI-ELISA

vergleichbare Werte ergaben. Der HD13.1/HU277-ELISA detektierte sowohl bei gut als auch bei schlechtdifferenzierten Karzinomzellen zuwenig uPAR. Die Daten sind in Abbildung 9 gezeigt.

### 5 3. Prognostische Relevanz des monoklonalen Antikörpers IIIF10

In einer klinischen Studie wurde der uPAR-Antigengehalt mit allen drei in Beispiel 2 beschriebenen ELISA-Systemen in Tumorproben von über 200 Mammakarzinompatientinnen bestimmt. Hier zeigte sich, daß die mit dem  
10 IIIF10/HU277-ELISA gemessenen Antigenwerte eine signifikante prognostische Relevanz für den Krankheitsverlauf, d.h. für Rezidivfreiheit bzw. Versterben aufweisen. Mit den beiden anderen ELISA-Systemen konnte eine derartige prognostische Relevanz nicht gefunden werden. Die Daten sind in Abbildung 10 gezeigt.

15

### 4. In vivo Wirkung des monoklonalen Antikörpers IIIF10

4 bis 6 Wochen alten Balb/C/3 Nacktmäusen wurden an der rechten Flanke  $6 \times 10^6$  humane Brustkrebszellen MDA-MB231 (Price et al., Cancer Res. 50  
20 (1990), 717-721) in einem Gesamtvolumen von 300  $\mu$ l injiziert. Vor der Injektion wurden die Krebszellen mit jeweils 200  $\mu$ g des murinen monoklonalen Antikörpers IIIF10 in PBS, pH 7,4 vermischt. Anschließend wurden die Mäuse alle drei Tage mit monoklonalen Antikörper IIIF10 in einer Dosis von  
25 2 mg/kg Körpergewicht bzw. 10 mg/kg Körpergewicht intraperitoneal in einem Injektionsvolumen von 300  $\mu$ l behandelt. Das Volumen der in den Mäusen auftretenden Primärtumoren in  $\text{cm}^3$  wurde nach vier Wochen durch Messung der beiden größten Durchmesser der Tumoren bestimmt. Den Kontrollmäusen wurde PBS pH 7,4 verabreicht, jede Gruppe bestand aus sechs Mäusen.

30

Die Ergebnisse sind in Abb. 11 gezeigt. Es ist zu erkennen, daß die Verabreichung des Antikörpers das Wachstum von Primärtumoren stark

verringerte. Die Inhibition des Wachstums war bei einer Verabreichung von 10 mg/kg Körpergewicht noch deutlicher als bei einer Verabreichung in einer Dosis von 2 mg/kg Körpergewicht ausgeprägt.

## 5. Herstellung von rekombinantem monoklonalem Antikörper IIIF10

mRNA von IIIF10 produzierenden Hybridomzellen wurde angereichert und in cDNA umgeschrieben. Die für die variablen Regionen der schweren (VH) und leichten (VL) Kette kodierenden cDNA-Fragmente wurden durch RT-PCR unter Verwendung genspezifischer Primer amplifiziert. Die VH- und VL-Gensegmente wurden in einen Phagemid-Vektor kloniert, um die Expression der variablen Regionen als einzelkettiger Antikörper (scFv) zu ermöglichen. Die scFv-Moleküle wurden durch Phagendisplay an der Oberfläche filamentöser Phagen als Fusionsprotein mit dem kleinen Phagenhüllprotein pIII präsentiert. Phagen, die eine funktionelle Expression von scFv-IIIF10 zeigten, wurden durch spezifische Bindung von uPAR selektiert. Die selektierten Phagen wurden zur Infektion von E.coli Zellen verwendet, was die Produktion und Sekretion von löslichen scFv-Molekülen in das Kulturmedium ermöglichte. Abbildung 12 zeigt die Bindung des scFv-Überstands an einen auf einer Festphase immobilisierten uPAR. Die Bindefähigkeit der Antikörper scFv-Anti-X und scFv-Anti-Y wurde zu Kontrollzwecken mitgeführt.

Um die Bindspezifität weiter zu testen, wurden Peptide eingesetzt, die zur Kartierung des Epitops des Antikörpers IIIF10 verwendet worden waren (Luther et al., J. Pathol 150 (1997), 1231-1244). Wie aus Abbildung 13 ersichtlich ist, kann nur ein Peptid, dessen Sequenz das vollständige IIIF10 Epitop auf uPAR (51-65) umfaßt, die Bindung des monoklonalen Antikörpers und von scFvIIIF10 an uPAR zu verhindern. Ein anderes Peptid mit einem unvollständigen Sequenzepitop (48 bis 59) ist um einen Faktor >100 weniger wirksam. Keines der Peptide kann die Bindung eines Kontrollantikörpers scFv-Anti-X an sein Zielprotein X verhindern.



- 21 -

Die Nukleotidsequenz der VH-cDNA und die korrespondierende Aminosäuresequenz sind in SEQ ID NO. 1/2 dargestellt. Die Nukleotidsequenz der VL-cDNA und die korrespondierende Aminosäuresequenz sind in SEQ ID NO. 3/4 dargestellt.

### Ansprüche

1. Verfahren zum Nachweis von Zellen in einer biologischen Probe  
5 umfassend die Schritte:
  - (a) Bereitstellen einer zu testenden Probe,
  - (b) Inkontaktbringen der Probe mit mindestens zwei verschiedenen, die nachzuweisenden Zellen erkennenden Bindemolekülen, wobei die Bindemoleküle mit jeweils verschiedenen  
10 Fluoreszenzfarbstoffen markiert werden, und
  - (c) Bestimmen der Fluoreszenzmarkierungen in der auf einer Festphase fixierten Probe.
2. Verfahren nach Anspruch 1,  
15 dadurch gekennzeichnet,  
daß man Tumorzellen nachweist.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2,  
dadurch gekennzeichnet,  
20 daß der Nachweis in einer Knochenmarksprobe erfolgt.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß man als zellspezifische Bindemoleküle Antikörper oder Antikörperfragmente oder/und Rezeptorliganden verwendet.  
25
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 2 bis 4,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß man ein erstes Cytokeratin-spezifisches Bindemolekül und ein  
30 zweites Urokinaserezeptor-spezifisches Bindemolekül verwendet.

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß die Bindemoleküle indirekt markiert werden.
- 5 7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß die Bindemoleküle direkt markiert werden.
8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7,  
10 dadurch gekennzeichnet,  
daß die Auswertung der Probe durch ein konfokales Laser-Scanning-  
Mikroskop oder durch ein Fluoreszenzmikroskop erfolgt.
9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8,  
15 dadurch gekennzeichnet,  
daß die Auswertung der Probe durch parallele oder/und sequentielle  
Bestimmung der Fluoreszenz der verschiedenen Markierungsgruppen  
erfolgt.
- 20 10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9, weiterhin umfassend  
eine Charakterisierung von durch Reaktion mit den Bindemolekülen  
identifizierten Zellen.
11. Verfahren nach Anspruche 10,  
25 dadurch gekennzeichnet  
daß die Charakterisierung eine ortsspezifische oder/und quantitative  
Bestimmung der Fluoreszenzmarkierung umfaßt.
12. Reagenzienkit zum Nachweis von Zellen in einer biologischen Probe  
30 umfassend  
(a) ein erstes, die nachzuweisenden Zellen erkennendes Bindemo-  
lekül und eine erste Fluoreszenz-Markierungsgruppe,

- (b) ein zweites, die nachzuweisenden Zellen erkennendes Bindemolekül und eine zweite Fluoreszenz-Markierungsgruppe, wobei das erste und das zweite Bindemolekül und die erste und die zweite Fluoreszenz-Markierungsgruppe verschieden sind und
- (c) Mittel zur Fixierung von Zellen auf einer Festphase.
13. Verwendung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 11 oder des Reagenzienkits nach Anspruch 12 zum Nachweis von Mikrometastasen in biologischen Proben.
14. Verwendung eines Antikörpers, der gegen das Epitop 52-60 des Urokinaserezeptors (uPAR) gerichtet ist, oder eines antigenbindenden Fragments davon zur Herstellung eines gegen uPAR auf Tumorzellen gerichteten diagnostischen oder therapeutischen Mittels.
15. Verwendung nach Anspruch 14 als diagnostisches Mittel zur Prognose des Verlaufs bei malignen Erkrankungen.
16. Verwendung nach Anspruch 14 als diagnostisches Mittel zum Nachweis von Tumorzellen in einer biologischen Probe.
17. Verwendung nach Anspruch 16 zum Nachweis von verstreuten Tumorzellen in Knochenmark.
18. Verwendung nach einem der Ansprüche 15 bis 17 in einem ELISA.
19. Verwendung nach einem der Ansprüche 15 bis 17 in einem Doppel-fluoreszenz-Nachweisverfahren.
20. Verwendung nach Anspruch 14 als therapeutisches Mittel zur Funktionsblockierung bei Tumorzellen.

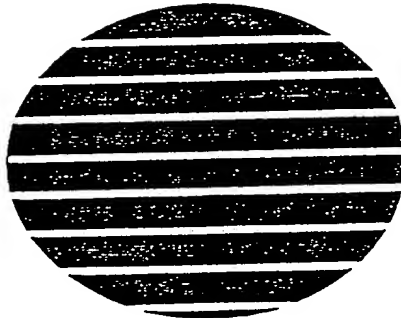
21. Verwendung nach Anspruch 14 in Form eines Konjugats mit einer cytotoxischen Gruppe zur Wachstums hemmung oder Abtötung von Tumorzellen.
- 5 22. Verwendung nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, daß die cytotoxische Gruppe ausgewählt wird aus radioaktiven Gruppen, Toxinen und Inhibitoren.
- 10 23. Verwendung nach einem der Ansprüche 14 bis 22, dadurch gekennzeichnet, daß der Antikörper ausgewählt wird aus dem monoklonalen Antikörper IIIF10, Fragmenten davon oder Antikörpern und Antikörperfragmenten mit äquivalenter Bindespezifität.
- 15 24. Rekombinante Nukleinsäure, die für ein Polypeptid mit Antikörpereigenschaften kodiert, umfassend
- (a) eine CDR3-VH-Sequenz kodierend für die Aminosäuresequenz (I):
- 20 D G S M G G F D Y
- oder/und
- (b) eine CDR-3-VL-Sequenz kodierend für die Aminosäuresequenz (II):
- L Q H W N Y P Y T
- 25 25. Rekombinantes Polypeptid mit Antikörpereigenschaften umfassend:
- (a) eine CDR3-VH-Aminosäuresequenz (I):
- D G S M G G F D Y
- oder/und
- 30 (b) eine CDR-3-VL-Aminosäuresequenz (II):
- L Q H W N Y P Y T

26. Rekombinantes Polypeptid nach Anspruch 25,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß es ein scFv-Antikörper-Fragment ist.
- 5 27. Rekombinantes Polypeptid nach Anspruch 25 oder 26,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß es ein humanisiertes Antikörperfragment ist.
- 10 28. Rekombinantes Polypeptid nach einem der Ansprüche 25 bis 27,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß es an eine Effektorgruppe gekoppelt ist.

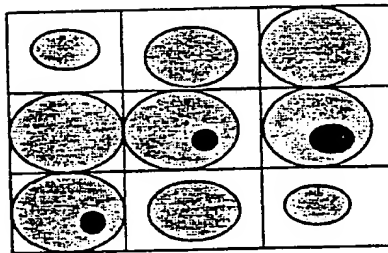
Abbildung 1

1 / 14

a



b



c

Y-Achse = Größe  
der Latexbeads

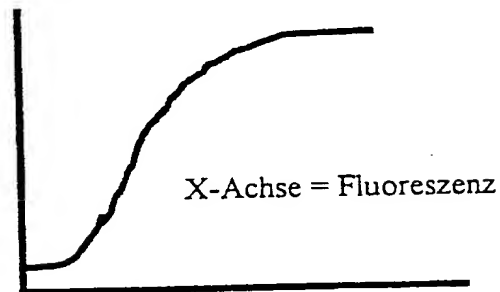
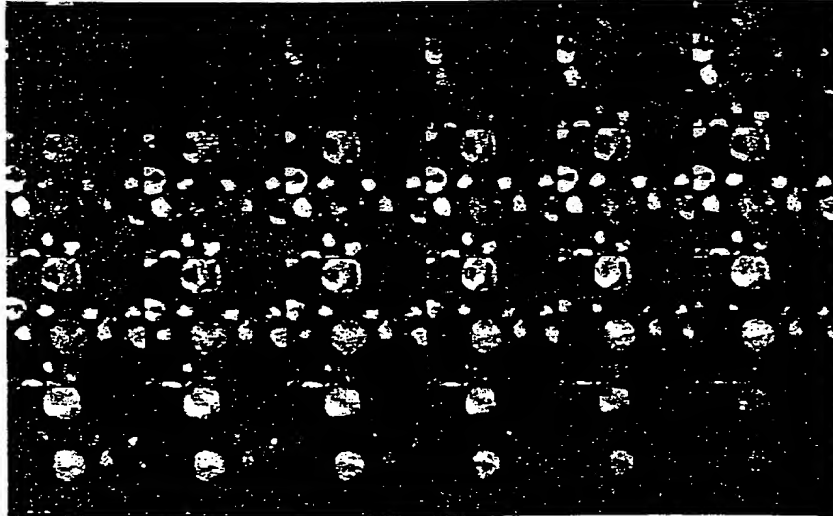


Abbildung 2

2 / 14

a



b

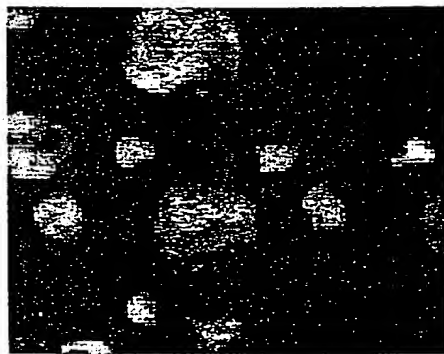
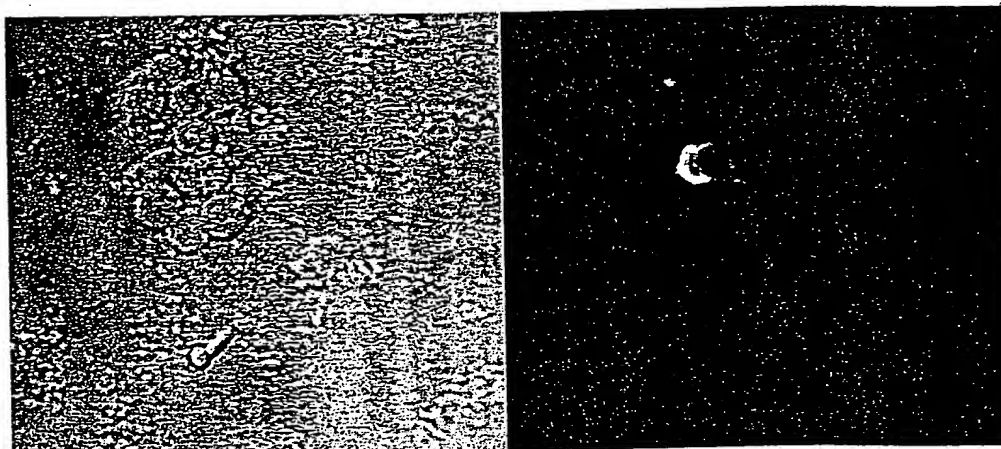




Abbildung 3

3 / 14

a



b

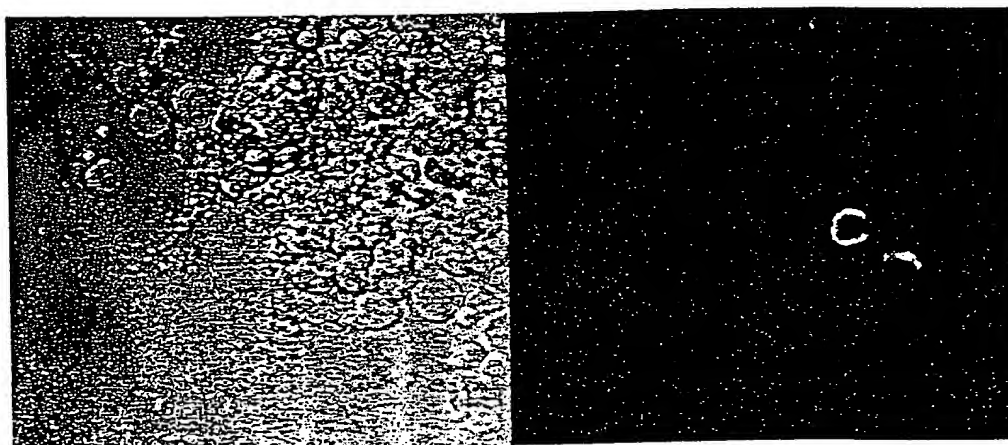
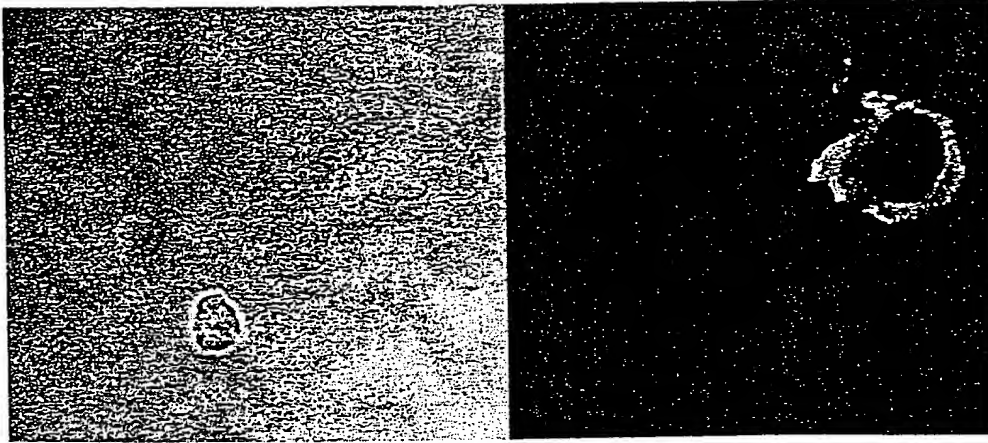


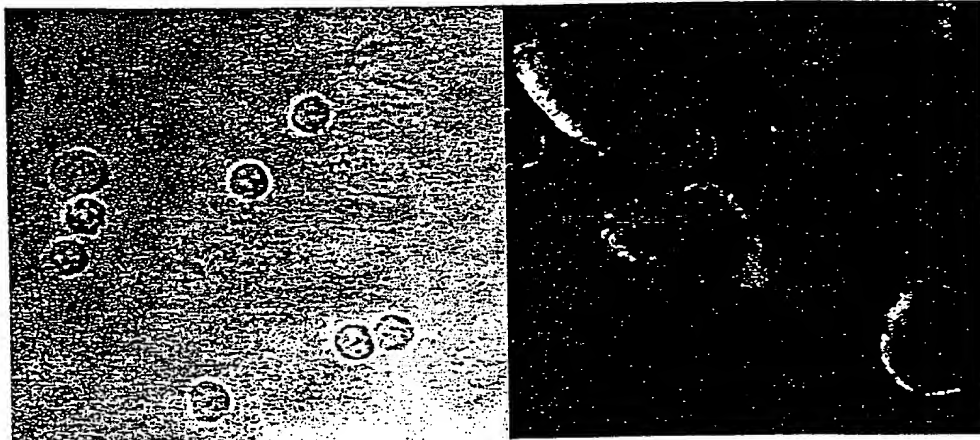
Abbildung 4

4 / 14

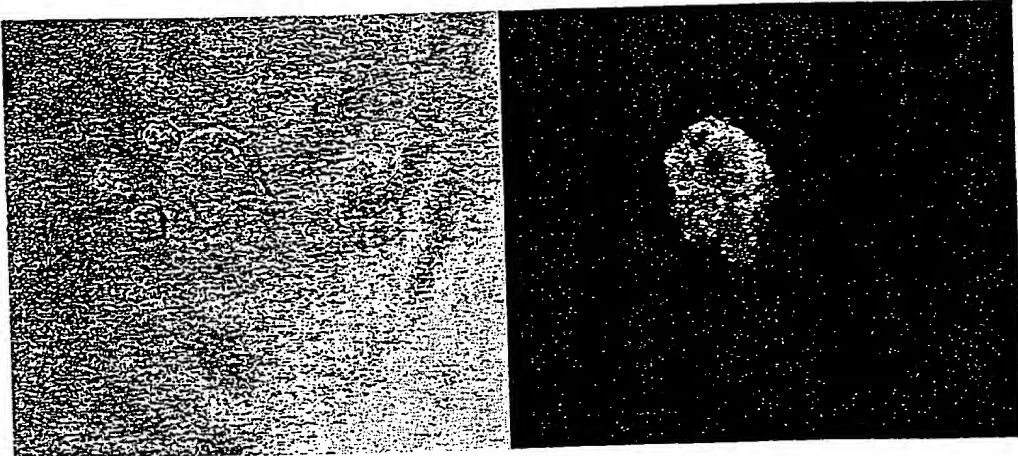
a



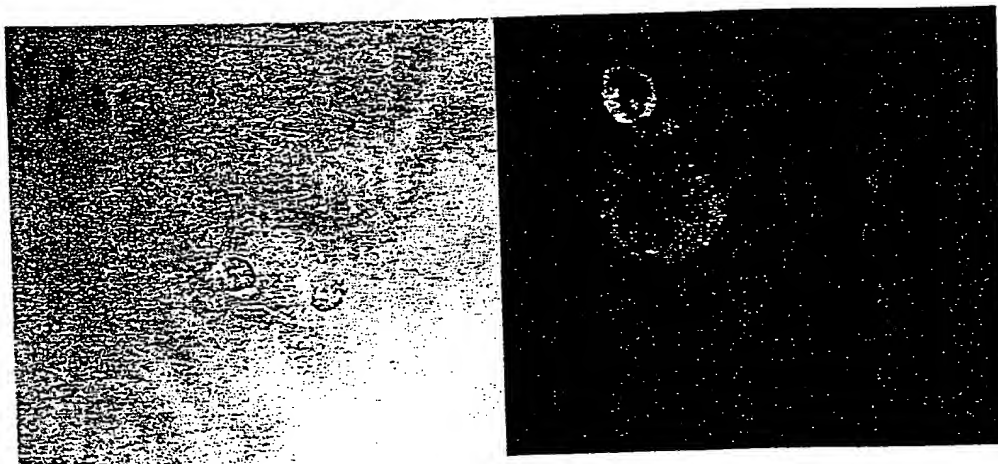
b



a



b



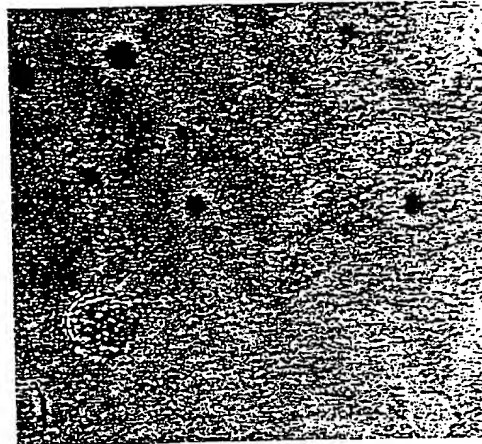
WO 00/62071

PCT/EP00/03347

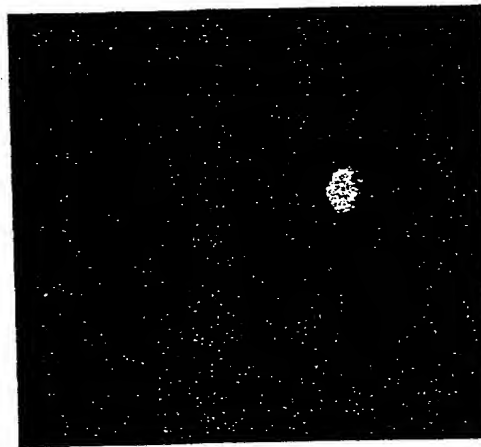
Abbildung 6

6 / 14

a



b



c

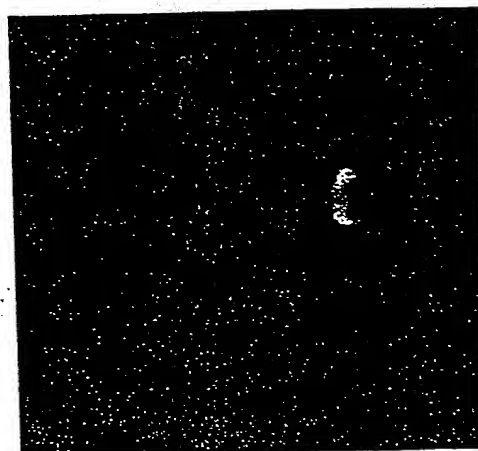
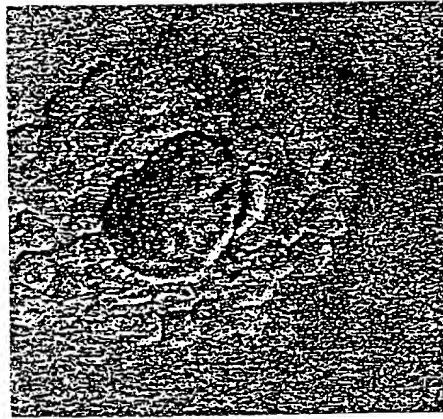


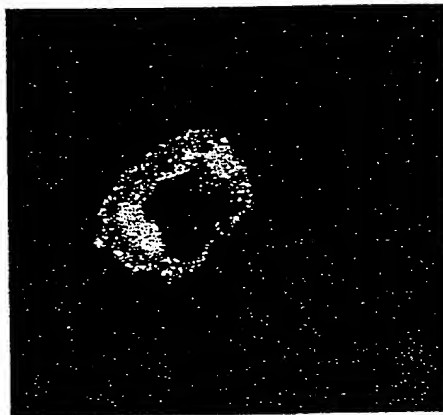
Abbildung 7

7 / 14

a



b



c

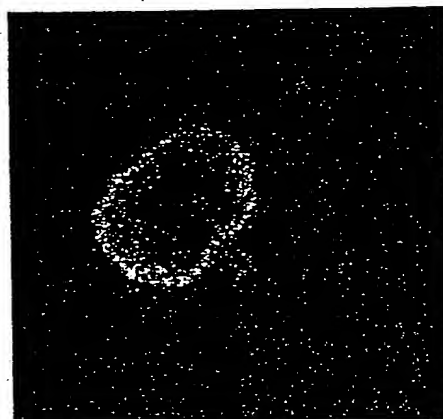
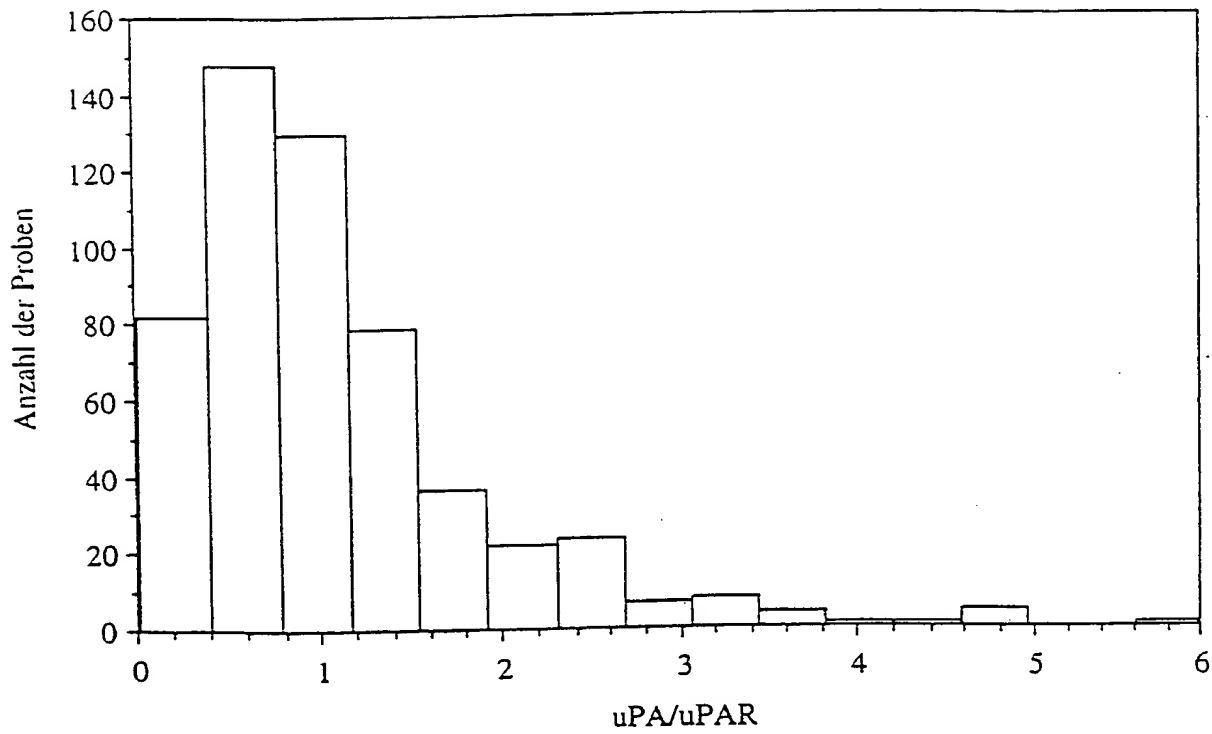


Abbildung 8

8 / 14

A



B

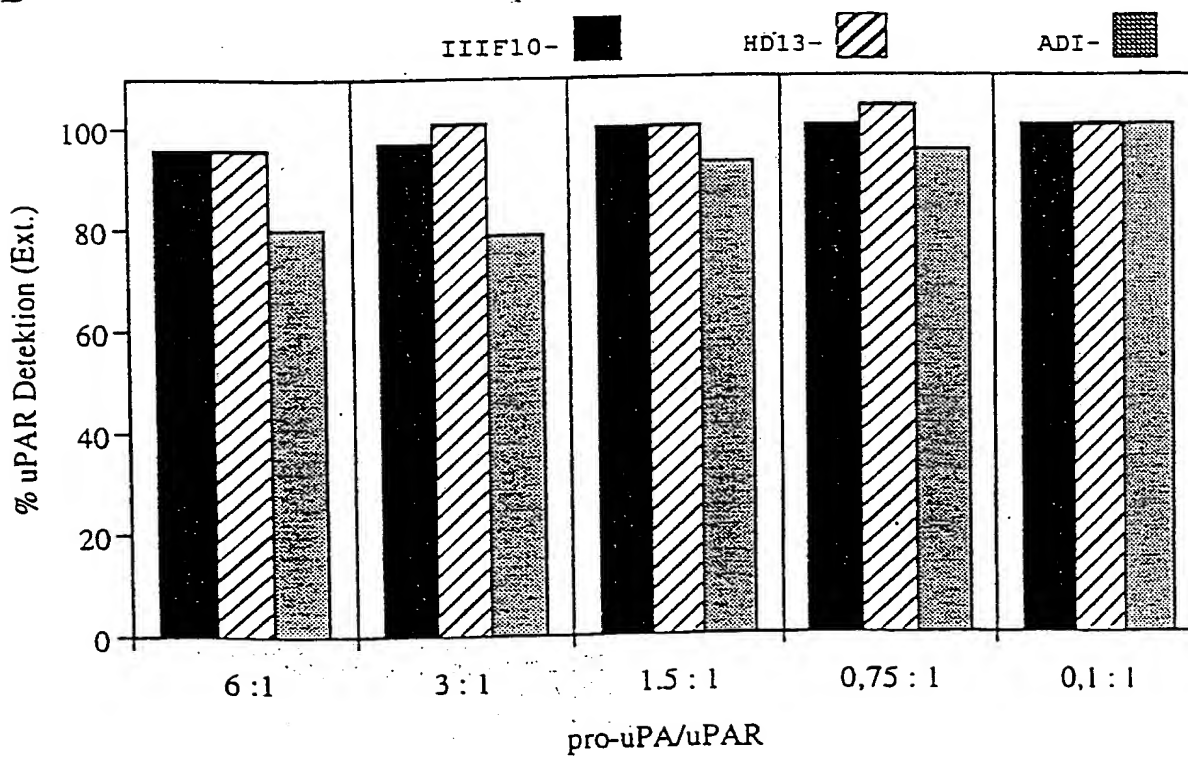


Abbildung 9

9 / 14

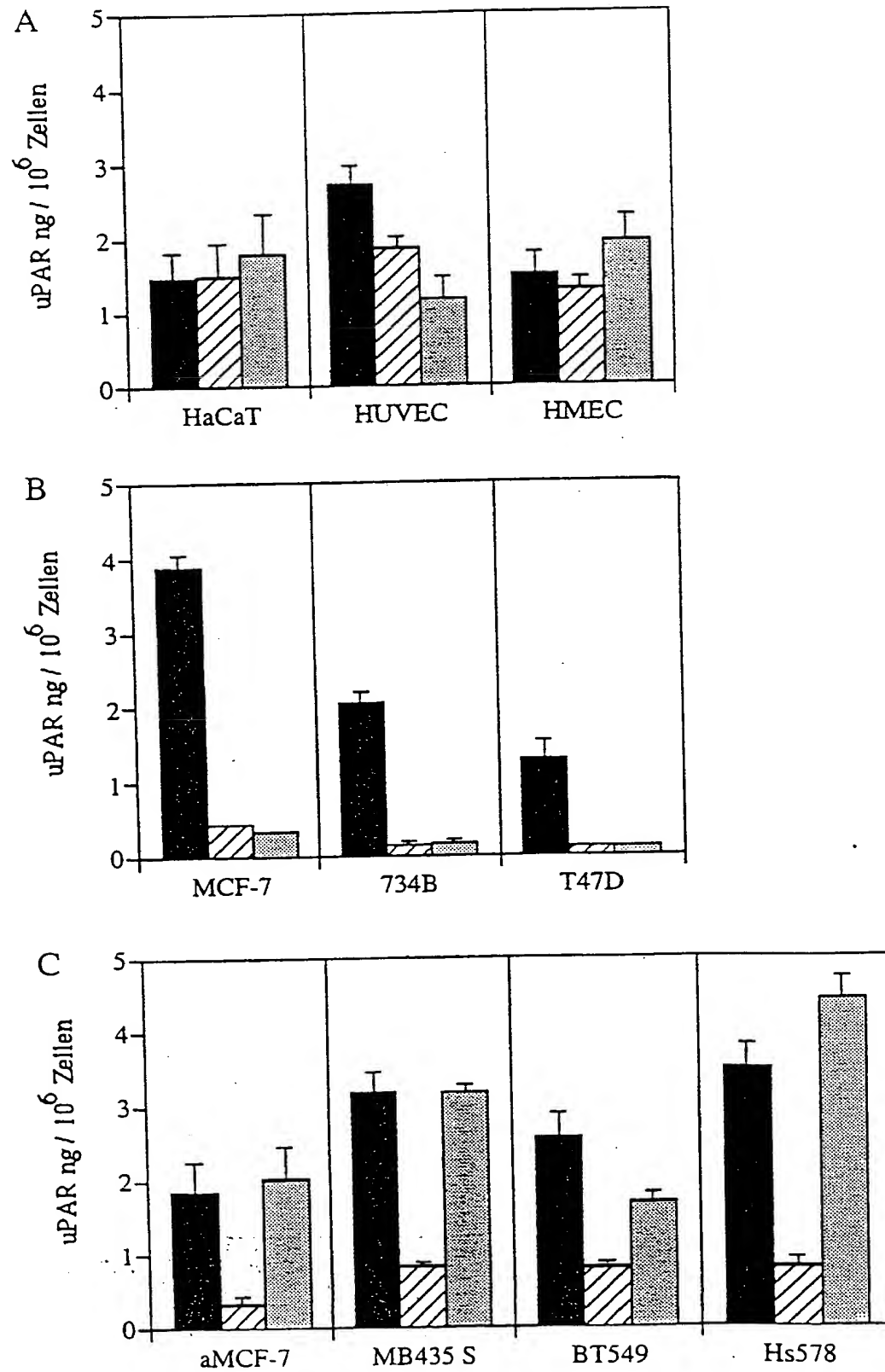
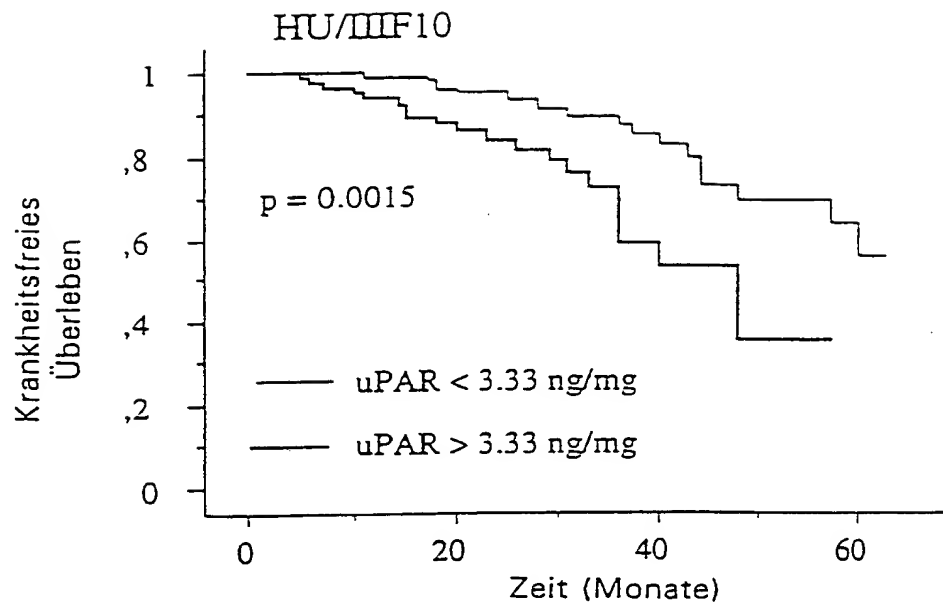


Abbildung 10

A



B

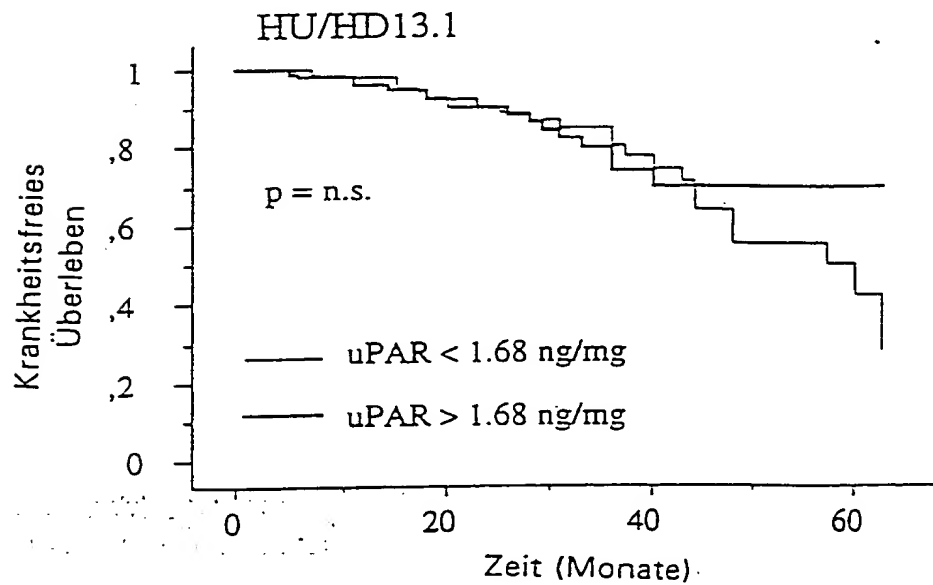
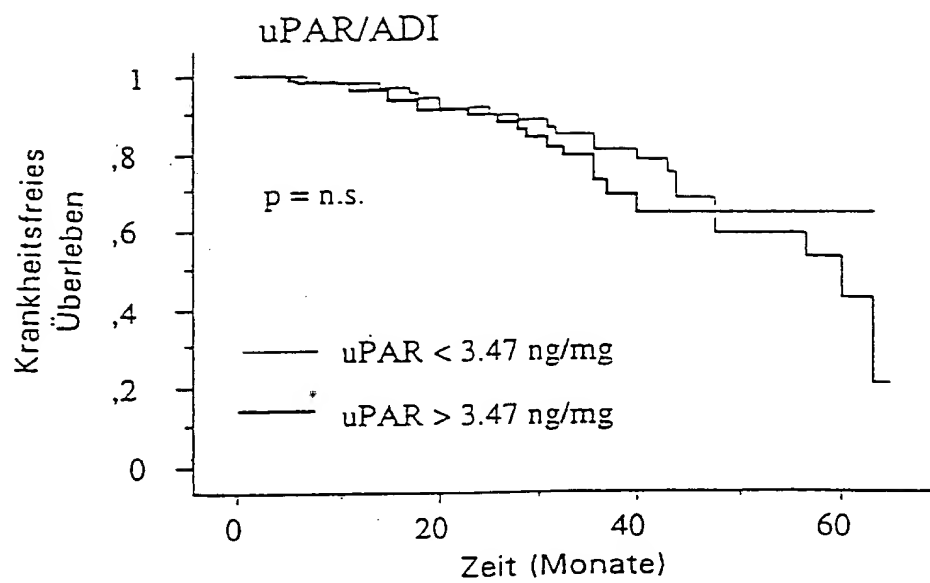




Abbildung 10

C



12 / 14

Abbildung 11

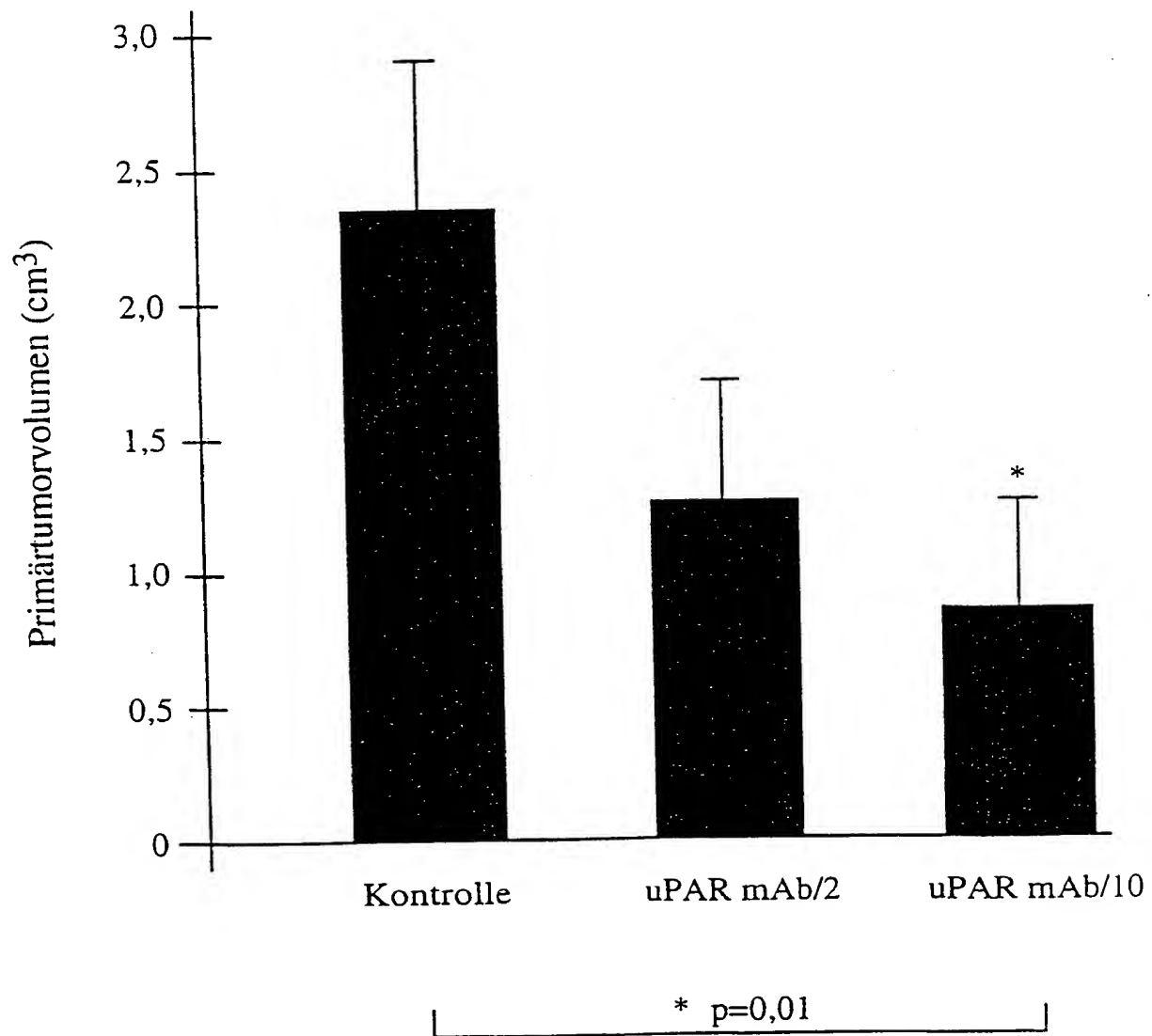


Abbildung 12

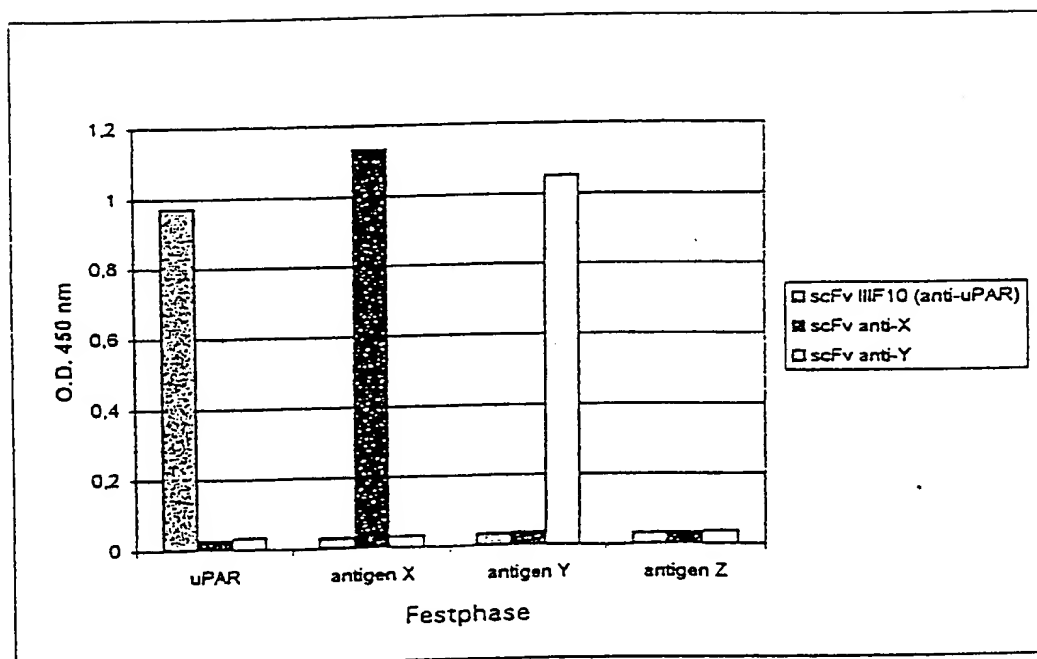
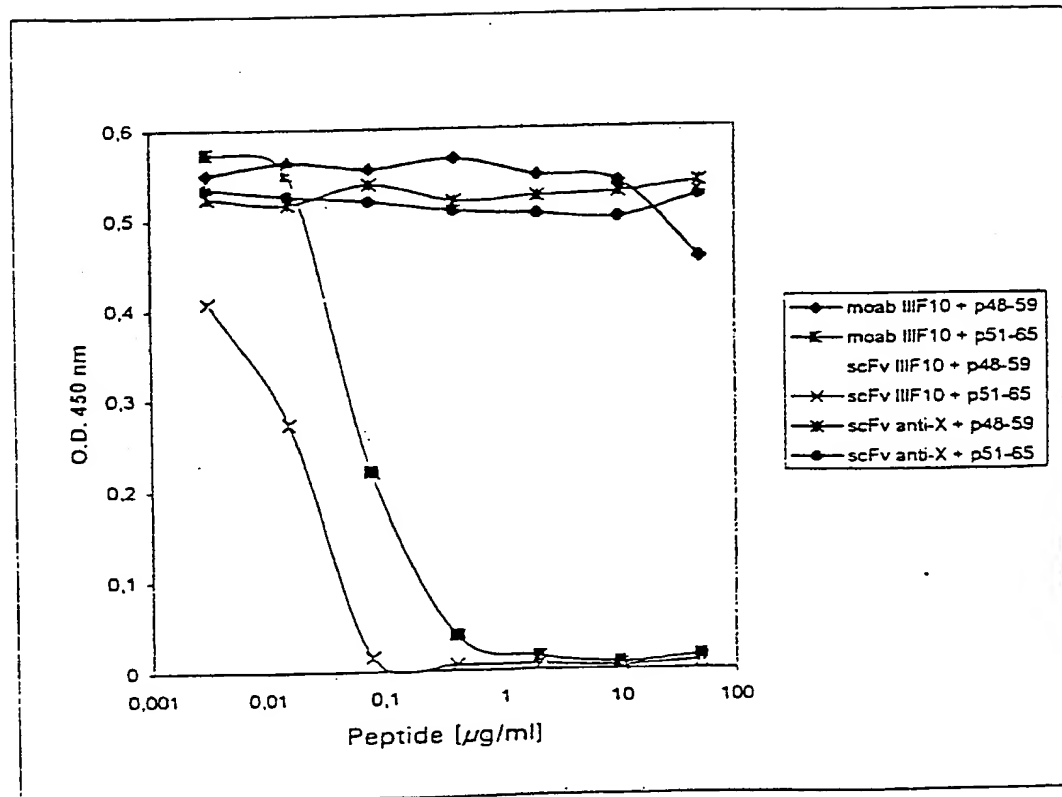


Abbildung 13



09/926323

WO 00/62071

PCT/EP00/03347

1

## SEQUENZPROTOKOLL

&lt;110&gt; Willex Biotechnology GmbH

<120> Diagnostischer und therapeutischer Einsatz von  
Antikörpern gegen den Urokinase-Rezeptor

&lt;130&gt; 19116PEP

&lt;140&gt;

&lt;141&gt;

&lt;160&gt; 2

&lt;170&gt; PatentIn Ver. 2.1

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 354

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
Phagensequenz

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(354)

&lt;400&gt; 1

cag	gtg	caa	ctg	cag	cag	tca	gga	cct	gag	ttg	gtg	aag	cct	ggg	gct	48
Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Gln	Ser	Gly	Pro	Glu	Leu	Val	Lys	Pro	Gly	Ala	
1				5					10					15		

tta	gtg	aag	ata	tcc	tgc	aag	gct	tct	ggt	tac	agt	ttc	aca	agc	tac	96
Leu	Val	Lys	Ile	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Ser	Phe	Thr	Ser	Tyr	
			20					25					30			

gat	ata	aat	tgg	gtg	aag	cgg	agg	cct	gga	cag	gga	ctt	gag	tgg	att	144
Asp	Ile	Asn	Trp	Val	Lys	Arg	Arg	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile	
		35					40					45				

gga	tgg	att	ttt	cct	gga	gat	ggt	agt	acc	aat	tac	aat	gag	aaa	ttc	192
Gly	Trp	Ile	Phe	Pro	Gly	Asp	Gly	Ser	Thr	Asn	Tyr	Asn	Glu	Lys	Phe	
	50						55					60				

aag	gac	aag	gcc	aca	ctg	act	gct	gac	aaa	tcc	tcc	agc	aca	gcc	tac	240
Lys	Asp	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Ala	Asp	Lys	Ser	Ser	Ser	Thr	Ala	Tyr	

2

65	70	75	80	
atg cag ctc aac agc ctg act tct gag aac tct gca gtc tat ttc tgt	288			
Met Gln Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asn Ser Ala Val Tyr Phe Cys				
85	90	95		
gca aga gat gga agt atg ggg ggg ttt gac tac tgg ggc caa ggg acc	336			
Ala Arg Asp Gly Ser Met Gly Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr				
100	105	110		
acg gtc acc gtc tcc tca			354	
Thr Val Thr Val Ser Ser				
115				

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 118

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
Phagensequenz

&lt;400&gt; 2

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala	
1 5 10 15	

Leu Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr	
20 25 30	

Asp Ile Asn Trp Val Lys Arg Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile	
35 40 45	

Gly Trp Ile Phe Pro Gly Asp Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe	
50 55 60	

Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr	
65 70 75 80	

Met Gln Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asn Ser Ala Val Tyr Phe Cys	
85 90 95	

Ala Arg Asp Gly Ser Met Gly Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr	
100 105 110	

Thr Val Thr Val Ser Ser	
115	

<210> 3  
 <211> 324  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(324)

<220>  
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
 Phagensequenz

<400> 3  
 gat gtt ttg atg acc caa act cca aaa ttc atg tcc aca tca gta gga 48  
 Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly  
 1 5 10 15  
 gac agg gtc agc atc acc tgc aag gcc agt cag aat gtt cgt act act 96  
 Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Arg Thr Thr  
 20 25 30  
 gta gcc tgg tat caa gag aaa cca ggg cag tct cct aaa gca ctg att 144  
 Val Ala Trp Tyr Gln Glu Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Ala Leu Ile  
 35 40 45  
 tac ttg gca tcc aac cgg cac act gga gtc cct gat cgc ttc aca ggc 192  
 Tyr Leu Ala Ser Asn Arg His Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly  
 50 55 60  
 agt gga tct gga aca gat ttc act ctc acc att agc aat gtg caa tct 240  
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Ser  
 65 70 75 80  
 gaa gac ctg gca gat tat ttc tgt ctg caa cat tgg aat tat ccg tac 288  
 Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Cys Leu Gln His Trp Asn Tyr Pro Tyr  
 85 90 95  
 acg ttc gga ggg ggc acc aag ctg gaa atc aaa cgg 324  
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg  
 100 105

<210> 4  
 <211> 108  
 <212> PRT  
 <213> Künstliche Sequenz  
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:

## Phagensequenz

&lt;400&gt; 4

Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly

1

5

10

15

Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Arg Thr Thr

20

25

30

Val Ala Trp Tyr Gln Glu Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Ala Leu Ile

35

40

45

Tyr Leu Ala Ser Asn Arg His Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly

50

55

60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Ser

65

70

75

80

Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Cys Leu Gln His Trp Asn Tyr Pro Tyr

85

90

95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg

100

105



Translation

09/926323

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

10

Applicant's or agent's file reference 19116P WO	<b>FOR FURTHER ACTION</b> See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/EP00/03347	International filing date (day/month/year) 13 April 2000 (13.04.00)	Priority date (day/month/year) 13 April 1999 (13.04.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC G01N 33/574		
Applicant WILEX BIOTECHNOLOGY GMBH		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.

2. This REPORT consists of a total of 8 sheets, including this cover sheet.

☒ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of 5 sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☒ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☒ Certain defects in the international application
- VIII ☒ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 20 September 2000 (20.09.00)	Date of completion of this report 08 June 2001 (08.06.2001)
Name and mailing address of the IPEA/EP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP00/03347

## I. Basis of the report

1. With regard to the **elements** of the international application:\*

- ☐ the international application as originally filed
- ☒ the description:  
pages 1-21, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☒ the claims:  
pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, as amended (together with any statement under Article 19  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages 1-23, filed with the letter of 23 May 2001 (23.05.2001)
- ☒ the drawings:  
pages 1/12-12/12, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☒ the sequence listing part of the description:  
pages 1-4, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_

2. With regard to the **language**, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language \_\_\_\_\_ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☒ contained in the international application in written form.
- ☒ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages \_\_\_\_\_
- ☐ the claims, Nos. \_\_\_\_\_
- ☐ the drawings, sheets/fig \_\_\_\_\_

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).\*\*

\* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

\*\* Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP00/03347

IV. Lack of unity of invention

1. In response to the invitation to restrict or pay additional fees the applicant has:

- ☐ restricted the claims.
- ☒ paid additional fees.
- ☐ paid additional fees under protest.
- ☐ neither restricted nor paid additional fees.

2. ☐ This Authority found that the requirement of unity of invention is not complied with and chose, according to Rule 68.1, not to invite the applicant to restrict or pay additional fees.

3. This Authority considers that the requirement of unity of invention in accordance with Rules 13.1, 13.2 and 13.3 is

- ☐ complied with.
- ☒ not complied with for the following reasons:

See supplemental sheet.

4. Consequently, the following parts of the international application were the subject of international preliminary examination in establishing this report:

- ☒ all parts.
- ☐ the parts relating to claims Nos. \_\_\_\_\_

# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.  
PCT/EP 00/03347

## Supplemental Box

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: IV.3

The examination department endorses the objection registered by the search department with respect to lack of unity of invention (PCT Rule 13.1). The different inventions are:

1. Claims 1-12, 17

Process for detecting cells in a biological sample using two different binding molecules that recognize the cells to be detected, wherein each of the binding molecules is labelled with a different fluorescent dye.

2. Claims 13-16, 18-23

Antibody or fragment thereof directed against epitope 52-60 of the urokinase receptor (uPAR).

# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP 00/03347

## V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

### 1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-12, 15, 17, 19-23	YES
	Claims	13, 14, 16, 18	NO
Inventive step (IS)	Claims	1-10, 17, 19-23	YES
	Claims	11-16, 18	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-23	YES
	Claims		NO

### 2. Citations and explanations

This report makes reference to the following documents:

D1: XUE *et al.*, CANCER RESEARCH, vol. 57, no. 9, 1 May 1997, pages 1682-1689

D2: EP-A-0 317 156 (BECTON DICKINSON CO), 24 May 1989

D3: LUTHER *et al.*, AMERICAN JOURNAL OF PATHOLOGY, vol. 150, no. 4, April 1997, pages 1231-1244

D4: ALLGAYER *et al.*, JOURNAL OF HISTOCHEMISTRY AND CYTOCHEMISTRY, vol. 45, no. 2, February 1997, pages 203-212

D5: HEISS *et al.*, NATURE MEDICINE, vol. 1, no. 10, October 1995 (1995-10), pages 1035-1039

#### 1. **Invention 1: Claims 1-12, 17**

1.1 The subject matter of Claims 1-10 and 17 is novel and involves an inventive step (PCT Article 33(2) and (3)).

D4 (abstract) and D5 (page 1039, column 1, lines 18-39), which are considered the closest prior art, disclose a process for detecting disseminated tumour

cells in bone marrow by a double staining method using a first cytokeratin-specific binding molecule and a second urokinase receptor-specific binding molecule. The subject matter of Claim 1 differs therefrom in that cells are detected using a double fluorescence method. The problem addressed by the present invention may therefore be seen to consist in providing a process for the quantitative detection of disseminated tumour cells in a biological sample that is both simple and sensitive.

D1 (page 1683, column 1, paragraphs "Indirect Immunofluorescence Staining for Microscopy" and "Fluorescence Microscopy and Data Quantitation") discloses a double fluorescence method for detecting tumour cells **in a sample completely consisting of tumour cells**. A person skilled in the art would not consider D1 since double fluorescence labelling is not known to be sufficiently sensitive for the quantitative detection of **disseminated cells**.

D2 (column 2, line 40 - column 3, line 20; column 4, lines 17-18) describes the detection of white blood cells in bone marrow and blood samples using a double fluorescence protocol. However, D2 pertains to the detection of a different cell type using different labels and a person skilled in the art would therefore not consider D2.

Therefore, the subject matter of Claim 1 involves an inventive step, as, likewise, does that of Claims 2-10 and 17.

- 1.2 The subject matter of Claims 11 does not involve an inventive step (PCT Article 33(3)).

D1 (page 1683, column 1, paragraphs "Indirect Immunofluorescence Staining for Microscopy" and "Fluorescence Microscopy and Data Quantitation") describes a process for labelling tumour cells using a double fluorescence protocol, wherein one of the binding molecules is urokinase receptor-specific. D1 also mentions an agent (3% paraformaldehyde) for fixing cells on a solid phase.

It is an obvious step for a person skilled in the art to provide the reagents required for a process in the form of a reagent kit and the subject matter of Claim 11 therefore does not involve an inventive step. This also applies to Claim 12.

**2. Invention 2: Claims 13-16, 18-23**

2.1 The subject matter of Claims 13, 14, 16 and 18 is not novel (PCT Article 33(2)).

D3 (abstract; page 1232, column 2, lines 7-10; page 1233, column 2, paragraph "ELISA"; page 1241, column 2, lines 14-47) discloses MAb IIIF10, which is directed against epitope 52-60 of uPAR, and the use of this antibody as a diagnostic tool (for prognosis of the course of malignant diseases and the detection of tumour cells in biological samples) or a therapeutic tool for the purpose of function blocking in tumour cells. D3 is therefore prejudicial to the novelty of the subject matter of Claims 13, 14, 16 and 18.

2.2 The subject matter of Claim 15 does not involve an inventive step (PCT Article 33(3)).

D4 (abstract), which is considered the closest prior art, discloses the use of an antibody directed against uPAR as a diagnostic tool for detecting tumour cells in bone marrow. The subject matter of Claim 15 differs therefrom in that a urokinase receptor-specific antibody directed against epitope 52-60 of the urokinase receptor is used.

However, use of MAb IIIF10, which is directed against epitope 52-60 of uPAR, for the same purpose has already been described in D3 (abstract; page 1232, column 2, lines 7-10). A person skilled in the art would consider D3. Therefore, the subject matter of Claim 15 does not involve an inventive step.

- 2.3 The subject matter of Claims 19-23 is novel and involves an inventive step (PCT Article 33(2) and (3)), since the prior art neither discloses nor suggests such recombinant nucleic acids (Claim 19) and recombinant polypeptides (Claim 20-23) having antibody properties.



**INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT**

International application No.

PCT/EP 00/03347

**VII. Certain defects in the international application**

The following defects in the form or contents of the international application have been noted:

Contrary to PCT Rule 5.1(a)(ii), the description does not cite D1 or indicate the relevant prior art disclosed therein.

# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP 00/03347

## VIII. Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

The expression "**Mikrometasen**" ("**micrometases**") used in Claim 13 is vague and unclear and leaves the reader uncertain as to the meaning of the relevant technical feature. Consequently, the definition of the subject matter of this claim is unclear (PCT Article 6).

# VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

## PCT

### INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)



T16

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts 19116P WO	<b>WEITERES VORGEHEN</b> siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsberichts (Formblatt PCT/IPEA/416)	
Internationales Aktenzeichen PCT/EP00/03347	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 13/04/2000	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Tag) 13/04/1999
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK G01N33/574		
Anmelder WILEX BIOTECHNOLOGY GMBH et al.		

1. Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.


2. Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 8 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.

☒ Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).

Diese Anlagen umfassen insgesamt 5 Blätter.

3. Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:

- I ☒ Grundlage des Berichts
- II ☐ Priorität
- III ☐ Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
- IV ☒ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
- V ☒ Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
- VI ☐ Bestimmte angeführte Unterlagen
- VII ☒ Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
- VIII ☒ Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Datum der Einreichung des Antrags  20/09/2000	Datum der Fertigstellung dieses Berichts  08.06.2001
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde:   Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Bevollmächtigter Bediensteter  Vanmontfort, D  Tel. Nr. +49 89 2399 8457



**I. Grundlage des Berichts**

1. Hinsichtlich der **Bestandteile** der internationalen Anmeldung (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigelegt, weil sie keine Änderungen enthalten (Regeln 70.16 und 70.17)*):  
**Beschreibung, Seiten:**

1-21                      ursprüngliche Fassung

**Patentansprüche, Nr.:**

1-23                      eingegangen am                      23/05/2001    mit Schreiben vom    23/05/2001

**Zeichnungen, Blätter:**

1/12-12/12                      ursprüngliche Fassung

**Sequenzprotokoll in der Beschreibung, Seiten:**

1-4, in der ursprünglich eingereichten Fassung.

2. Hinsichtlich der **Sprache**: Alle vorstehend genannten Bestandteile standen der Behörde in der Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht worden ist, zur Verfügung oder wurden in dieser eingereicht, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

Die Bestandteile standen der Behörde in der Sprache: zur Verfügung bzw. wurden in dieser Sprache eingereicht; dabei handelt es sich um

- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen Recherche eingereicht worden ist (nach Regel 23.1(b)).
- ☐ die Veröffentlichungssprache der internationalen Anmeldung (nach Regel 48.3(b)).
- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen vorläufigen Prüfung eingereicht worden ist (nach Regel 55.2 und/oder 55.3).

3. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale vorläufige Prüfung auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das:

- ☒ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.
- ☒ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.
- ☐ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfassten Informationen dem schriftlichen

Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

4. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

- ☐ Beschreibung,      Seiten:
- ☐ Ansprüche,      Nr.:
- ☐ Zeichnungen,      Blatt:

5. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)).

*(Auf Ersatzblätter, die solche Änderungen enthalten, ist unter Punkt 1 hinzuweisen; sie sind diesem Bericht beizufügen).*

6. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

#### **IV. Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung**

1. Auf die Aufforderung zur Einschränkung der Ansprüche oder zur Zahlung zusätzlicher Gebühren hat der Anmelder:

- ☐ die Ansprüche eingeschränkt.
- ☒ zusätzliche Gebühren entrichtet.
- ☐ zusätzliche Gebühren unter Widerspruch entrichtet.
- ☐ weder die Ansprüche eingeschränkt noch zusätzliche Gebühren entrichtet.

2. ☐ Die Behörde hat festgestellt, daß das Erfordernis der Einheitlichkeit der Erfindung nicht erfüllt ist, und hat gemäß Regel 68.1 beschlossen, den Anmelder nicht zur Einschränkung der Ansprüche oder zur Zahlung zusätzlicher Gebühren aufzufordern.

3. Die Behörde ist der Auffassung, daß das Erfordernis der Einheitlichkeit der Erfindung nach den Regeln 13.1, 13.2 und 13.3

- ☐ erfüllt ist
- ☒ aus folgenden Gründen nicht erfüllt ist:  
**siehe Beiblatt**

4. Daher wurde zur Erstellung dieses Berichts eine internationale vorläufige Prüfung für folgende Teile der internationalen Anmeldung durchgeführt:

- ☒ alle Teile.
- ☐ die Teile, die sich auf die Ansprüche Nr. beziehen.

**V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung**

**1. Feststellung**

Neuheit (N)	Ja: Ansprüche	1-12, 15, 17, 19-23
	Nein: Ansprüche	13, 14, 16, 18
Erfinderische Tätigkeit (ET)	Ja: Ansprüche	1-10, 17, 19-23
	Nein: Ansprüche	11-16, 18
Gewerbliche Anwendbarkeit (GA)	Ja: Ansprüche	1-23
	Nein: Ansprüche	

**2. Unterlagen und Erklärungen  
siehe Beiblatt**

**VII. Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung**

Es wurde festgestellt, daß die internationale Anmeldung nach Form oder Inhalt folgende Mängel aufweist:  
**siehe Beiblatt**

**VIII. Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung**

Zur Klarheit der Patentansprüche, der Beschreibung und der Zeichnungen oder zu der Frage, ob die Ansprüche in vollem Umfang durch die Beschreibung gestützt werden, ist folgendes zu bemerken:  
**siehe Beiblatt**

**Zu Punkt IV**

Die Prüfungsabteilung schließt sich dem von der Recherchenabteilung wegen mangelnder Einheitlichkeit vorgebrachten Einwand an (Regel 13.1 PCT).

Die verschiedenen Erfindungen sind:

1. Ansprüche 1-12, 17

Verfahren zum Nachweis von Zellen in einer biologischen Probe unter Verwendung von zwei verschiedenen, die nachzuweisenden Zellen erkennenden Bindemolekülen, wobei die Bindemoleküle mit jeweils verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert werden.

2. Ansprüche 13-16, 18-23

Antikörper oder dessen Fragment, der gegen das Epitop 52-60 des Urokinaserezeptors (uPAR) gerichtet ist.

**Zu Punkt V**

Es wird auf die folgenden Dokumente verwiesen:

D1 XUE et al., CANCER RESEARCH, Bd. 57, Nr. 9, 1. Mai 1997, Seiten 1682-1689

D2 EP 0 317 156 A (BECTON DICKINSON CO) 24. Mai 1989

D3 LUTHER et al., AMERICAN JOURNAL OF PATHOLOGY, Bd. 150, Nr. 4, April 1997, Seiten 1231-1244

D4 ALLGAYER et al., JOURNAL OF HISTOCHEMISTRY AND CYTOCHEMISTRY, Bd. 45, Nr. 2, Februar 1997, Seiten 203-212

D5 HEISS et al., NATURE MEDICINE, Bd. 1, Nr. 10, Oktober 1995 (1995-10), Seiten 1035-1039

**1. Erfindung 1: Ansprüch 1-12, 17**

- 1.1 Der Gegenstand der Ansprüche 1-10 und 17 ist neu und beruht auf einer erfinderischen Tätigkeit (Artikel 33(2) and 33(3) PCT).

D4 (Zusammenfassung) und D5 (Seite 1039, Spalte 1, Zeilen 18-39), die als nächstliegender Stand der Technik angesehen werden, offenbaren ein Verfahren zum Nachweis von seltenen Tumorzellen in Knochenmark über eine Doppelmarkierungsmethode unter Verwendung von einem ersten Cytokeratin-spezifischen Bindemolekül und einem zweiten Urokinaserezeptor-spezifischen Bindemolekül. Der Gegenstand des Anspruchs 1 unterscheidet sich dadurch daß der Nachweis unter Verwendung einer Doppelfluoreszenzmethode durchgeführt wird. Die mit der vorliegenden Erfindung zu lösende Aufgabe kann somit darin gesehen werden ein einfaches und gleichzeitig sensitives Verfahren zum quantitativen Nachweis seltener Tumorzellen in einer biologischen Probe bereitzustellen.

D1 (Seite 1683, Spalte 1, Absätze "Indirect Immunofluorescence Staining for Microscopy" und "Fluorescence Microscopy and Data Quantitation) offenbart ein Doppelfluoreszenz-Verfahren zum Nachweis von Tumorzellen **in einer vollständig aus Tumorzellen bestehende Probe**. Der Fachmann würde D1 nicht in Betracht ziehen weil es nicht bekannt ist daß beim Nachweis von derart **seltenen Zellen** eine Doppelfluoreszenzmarkierung ausreichend sensitiv ist für einen quantitativen Nachweis.

D2 (Spalte 2 Zeile 40-Spalte 3 Zeile 20, Spalte 4 Zeilen 17-18) beschreibt den Nachweis unter Verwendung eines Doppelfluoreszenzprotokolls von weißen Blutzellen aus Knochenmark- und Blutproben. Es werden jedoch andere Zellen unter Verwendung anderer Marker nachgewiesen. Deshalb würde der Fachmann D2 nicht in Betracht ziehen.

Aus diesem Grund beruht der Gegenstand des Anspruchs 1 auf einer erfinderischen Tätigkeit. Dasselbe trifft für Ansprüche 2-10 und 17 zu.

- 1.2 Der Gegenstand der Ansprüche 11 beruht nicht auf einer erfinderischen Tätigkeit (Artikel 33(3) PCT).

D1 (Seite 1683, Spalte 1, Absätze "Indirect Immunofluorescence Staining for Microscopy" und "Fluorescence Microscopy and Data Quantitation) beschreibt ein Verfahren zur Markierung von Tumorzellen unter Verwendung eines



Doppelfluoreszenzprotokolls und wobei eines der Bindemoleküle für den Urokinase-Rezeptor spezifisch ist. D1 erwähnt auch ein Mittel (3% Paraformaldehyd) zur Fixierung von Zellen auf einer Festphase.

Es ist naheliegend für den Fachmann die Reagenzien eines Verfahrens in Form eines Reagenzienkit zu Verfügung zu stellen. Dem Gegenstand des Anspruchs 11 liegt daher keine erfinderische Tätigkeit zugrunde. Dasselbe trifft für Anspruch 12 zu.

## **2. Erfindung 2: Ansprüche 13-16, 18-23**

### **2.1 Der Gegenstand der Ansprüche 13, 14, 16 und 18 ist nicht neu (Artikel 33(2) PCT).**

D3 (Zusammenfassung; Seite 1232, Spalte 2, Zeilen 7-10; Seite 1233, Spalte 2, Absatz "ELISA"; Seite 1241, Spalte 2, Zeilen 14-47) offenbart Antikörper MAb IIF10, der gegen das Epitop 52-60 des uPAR gerichtet ist und die Verwendung dieses Antikörper als diagnostisches Mittel (zur Prognose der Verlaufs bei malignen Erkrankungen und zum Nachweis von Tumorzellen in einer biologischen Probe) oder als therapeutisches Mittel zur Funktionsblockierung bei Tumorzellen. Daher steht D3 dem Gegenstand der Ansprüche 13, 14, 16 und 18 neuheitsschädlich entgegen.

### **2.2 Der Gegenstand des Anspruchs 15 beruht nicht auf einer erfinderischen Tätigkeit (Artikel 33(3) PCT).**

D4 (Zusammenfassung), das als nächstliegender Stand der Technik angesehen wird, offenbart die Verwendung eines Antikörpers, der gegen uPAR gerichtet ist, als diagnostisches Mittel zum Nachweis von Tumorzellen in Knochenmark. Der Gegenstand des Anspruchs 15 unterscheidet sich dadurch daß man ein Urokinaserezeptor-spezifisches Antikörper, der gegen das Epitope 52-60 des Urokinaserezeptors gerichtet ist, verwendet.

Der Antikörper MAb IIF10, der gegen das Epitop 52-60 des uPAR gerichtet ist, wurde jedoch schon für denselben Zweck benutzt in D3 (Zusammenfassung; Seite 1232, Spalte 2, Zeilen 7-10). Der Fachmann würde D3 in Betracht ziehen. Aus diesem Grund beruht der Gegenstand des Anspruchs 15 nicht auf einer erfinderischen Tätigkeit.

- 2.3 Der Gegenstand der Ansprüche 19-23 ist neu und beruht auf einer erfinderischen Tätigkeit (Artikel 33(2) und 33(3) PCT) weil derartige rekombinanten Nukleinsäuren (Anspruch 19) und rekombinantes Polypeptide (Anspruch 20-23) mit Antikörpereigenschaften im Stand der Technik weder offenbart noch nahegelegt werden.

**Zu Punkt VII**

Im Widerspruch zu den Erfordernissen der Regel 5.1 a) ii) PCT werden in der Beschreibung weder der in dem Dokument D1 offenbarte einschlägige Stand der Technik noch dieses Dokument angegeben.

**Zu Punkt VIII**

Der in dem Anspruch 13 benutzte Ausdruck "**Mikrometasen**" ist vage und unklar und läßt den Leser über die Bedeutung des betreffenden technischen Merkmals im Ungewissen. Dies hat zur Folge, daß die Definition des Gegenstands dieses Anspruchs nicht klar ist (Artikel 6 PCT).

23. Mai 2001

- 1 -

### **Ansprüche**

1. Verfahren zum quantitativen Nachweis von epithelialen Tumorzellen in einer biologischen Probe, wobei die biologische Probe die nachzuweisenden Zellen im Bereich von  $1:10^4$  bis  $1:10^7$  der gesamten in der Probe vorhandenen Zellen enthält, umfassend die Schritte:
  - (a) Bereitstellen einer zu testenden Probe,
  - (b) Inkontaktbringen der Probe mit mindestens zwei verschiedenen, die nachzuweisenden Zellen erkennenden Bindemolekülen, wobei die Bindemoleküle mit jeweils verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert werden, wobei eines der Bindemoleküle für den Urokinase-Rezeptor spezifisch ist, und
  - (c) Bestimmen der Menge der Fluoreszenzmarkierungen in der auf einer Festphase fixierten Probe.
2. Verfahren nach Anspruch 1,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
daß der Nachweis in einer Knochenmarksprobe erfolgt.
3. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 2,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
daß man als zellspezifische Bindemoleküle Antikörper oder Antikörperfragmente oder/und Rezeptorliganden verwendet.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 2 bis 3,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
daß man ein zweites Cytokeratin-spezifisches Bindemolekül verwendet.

- 2 -

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
daß die Bindemoleküle indirekt markiert werden.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
daß die Bindemoleküle direkt markiert werden.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
daß die quantitative Auswertung der Probe durch ein konfokales Laser-Scanning-Mikroskop oder durch ein Fluoreszenzmikroskop erfolgt.
8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
daß die Auswertung der Probe durch parallele oder/und sequentielle Bestimmung der Fluoreszenz der verschiedenen Markierungsgruppen erfolgt.
9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, weiterhin umfassend eine Charakterisierung von durch Reaktion mit den Bindemolekülen identifizierten Zellen.
10. Verfahren nach Anspruch 9,  
**dadurch gekennzeichnet**  
daß die Charakterisierung eine ortsspezifische Bestimmung der Fluoreszenzmarkierung umfaßt.

- 3 -

11. Reagenzienkit zum quantitativen Nachweis von Zellen in einer biologischen Probe umfassend
  - (a) ein erstes, die nachzuweisenden Zellen erkennendes Bindemolekül und eine erste Fluoreszenz-Markierungsgruppe, wobei das Bindemolekül für den Urokinase-Rezeptor spezifisch ist,
  - (b) ein zweites, die nachzuweisenden Zellen erkennendes Bindemolekül und eine zweite Fluoreszenz-Markierungsgruppe, wobei das erste und das zweite Bindemolekül und die erste und die zweite Fluoreszenz-Markierungsgruppe verschieden sind und
  - (c) Mittel zur Fixierung von Zellen auf einer Festphase.
12. Verwendung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 10 oder des Reagenzienkits nach Anspruch 11 zum Nachweis von Mikrometasen in biologischen Proben.
13. Verwendung eines Antikörpers, der gegen das Epitop 52-60 des Urokinaserezeptors (uPAR) gerichtet ist, oder eines antigenbindenden Fragments davon zur Herstellung eines gegen uPAR auf Tumorzellen gerichteten diagnostischen Mittels zur Erstellung einer Prognose des Verlaufs bei malignen Erkrankungen.
14. Verwendung nach Anspruch 13 als diagnostisches Mittel zum Nachweis von Tumorzellen in einer biologischen Probe.
15. Verwendung nach Anspruch 14 zum Nachweis von verstreuten Tumorzellen in Knochenmark.
16. Verwendung nach einem der Ansprüche 14 bis 15 in einem ELISA.
17. Verwendung nach einem der Ansprüche 14 bis 15 in einem Doppel-fluoreszenz-Nachweisverfahren.

- 4 -

18. Verwendung nach einem der Ansprüche 13 bis 17,  
**dadurch g kennzeichnet,**  
daß der Antikörper ausgewählt wird aus dem monoklonalen Antikörper III F10, Fragmenten davon oder Antikörpern und Antikörperfragmenten mit äquivalenter Bindspezifität.
19. Rekombinante Nukleinsäure, die für ein Polypeptid mit Antikörpereigenschaften kodiert, umfassend
- (a) eine CDR3-VH-Sequenz kodierend für die Aminosäuresequenz  
(I):  
D G S M G G F D Y  
oder/und
- (b) eine CDR-3-VL-Sequenz kodierend für die Aminosäuresequenz  
(II):  
L Q H W N Y P Y T
20. Rekombinantes Polypeptid mit Antikörpereigenschaften umfassend:
- (a) eine CDR3-VH-Aminosäuresequenz (I):  
D G S M G G F D Y  
oder/und
- (b) eine CDR-3-VL-Aminosäuresequenz (II):  
L Q H W N Y P Y T
21. Rekombinantes Polypeptid nach Anspruch 20,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
daß es ein scFv-Antikörper-Fragment ist.
22. Rekombinantes Polypeptid nach Anspruch 20 oder 21,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
daß es ein humanisiertes Antikörperfragment ist.

- 5 -

23. Rekombinantes Polypeptid nach einem der Ansprüche 20 bis 22,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß es an eine Effektorgruppe gekoppelt ist.

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

/EP 00/03347

<b>A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGS- GEGENSTANDES</b>		
IPK 7	G01N33/574 A61K51/10	G01N33/577 C12N15/13
	G01N33/68 C07K16/28	A61K39/395 C07K19/00
A61K47/48		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK		
<b>B. RECHERCHIERTE GEBIETE</b>		
Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)		
IPK 7 G01N C07K		
Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen		
Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)		
BIOSIS, EMBASE, CHEM ABS Data, WPI Data, PAJ, EPO-Internal, STRAND		
<b>C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN</b>		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	US 5 234 816 A (TERSTAPPEN LEON W M M) 10. August 1993 (1993-08-10)	1-4,6-13
Y	das ganze Dokument	1,5
X	W. XUE ET AL.: "Urokinase-type plasminogen activator receptors associate with betal and beta3 integrins of fibrosarcoma cells: dependence on extracellular matrix components" CANCER RESEARCH, Bd. 57, Nr. 9, 1. Mai 1997 (1997-05-01), Seiten 1682-1689, XP002117246 Baltimore, MD, VSA	1-4,6-13
Y	Zusammenfassung; Abbildung 1	1,5
X	EP 0 317 156 A (BECTON DICKINSON CO) 24. Mai 1989 (1989-05-24) Ansprüche 1-10	1,3,4, 6-13
-/-		
<input checked="" type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen <input checked="" type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie		
* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen : "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist "E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt) "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist "T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist "&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche		Absendedatum des internationalen Recherchenberichts
28. Juli 2000		18/08/2000
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Bevollmächtigter Bediensteter  Nooij, F



C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	<p>T. LUTHER ET AL.: "Epitope-mapped monoclonal antibodies as tools for functional and morphological analyses of the human urokinase receptor in tumor tissue"</p> <p>AMERICAN JOURNAL OF PATHOLOGY, Bd. 150, Nr. 4, April 1997 (1997-04), Seiten 1231-1244, XP002117251 Hagerstown, MD, VSA in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument</p> <p>---</p>	14-16, 18,20, 23-25
X	<p>R TODD ET AL.: "CD87 Workshop Panel report (pages 1016-1020 in 'Leucocyte Typing VI', Eds. T Kishimoto et al.)" 1997, GARLAND PUBLISHING, INC. XP002117252 in der Anmeldung erwähnt Abbildung Tabellen</p> <p>---</p>	14-16, 18,20, 23-25
X	<p>V. MAGDOLEN ET AL.: "Epitope-mapped monoclonal antibodies directed to the human urokinase receptor (uPAR, CD87)." TISSUE ANTIGENS, Bd. 48, Nr. 4-2, Oktober 1996 (1996-10), Seite 424 XP000929590 Kopenhagen, Dänemark Zusammenfassung MC-2-02</p> <p>---</p>	14-16, 20,23-25
X	<p>K. FISCHER ET AL.: "Urokinase induces proliferation of human ovarian cancer cells: characterization of structural elements required for growth factor function." FEBS LETTERS, Bd. 438, Nr. 1-2, 30. Oktober 1998 (1998-10-30), Seiten 101-105, XP002143814 Amsterdam, die Niederlande Zusammenfassung Abbildung 3</p> <p>---</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	14,20, 23-25

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	<p>H. ALLGAYER ET AL.: "Immunocytochemical phenotyping of disseminated tumor cells in bone marrow by uPA receptor and CK18: investigation of sensitivity and specificity of an immunogold/alkaline phosphatase double staining protocol" JOURNAL OF HISTOCHEMISTRY AND CYTOCHEMISTRY, Bd. 45, Nr. 2, Februar 1997 (1997-02), Seiten 203-212, XP002117247 Baltimore, MD, VSA in der Anmeldung erwähnt Zusammenfassung</p>	1,5
Y	<p>M. HEISS ET AL.: "Individual development and uPA-receptor expression of disseminated tumour cells in bone marrow: a reference to early systemic disease in solid cancer" NATURE MEDICINE, Bd. 1, Nr. 10, Oktober 1995 (1995-10), Seiten 1035-1039, XP002117248 New York, NY, VSA in der Anmeldung erwähnt Seite 1039, Spalte 1, Zeile 18, Absatz 2 - Zeile 39</p>	1,5
A	<p>I. FUNKE ET AL.: "Comparative analyses of bone marrow micrometastases in breast and gastric cancer" INTERNATIONAL JOURNAL OF CANCER, Bd. 65, Nr. 6, 15. März 1996 (1996-03-15), Seiten 755-761, XP002117249 New York, NY, VSA in der Anmeldung erwähnt Zusammenfassung</p>	1
A	<p>WO 94 09363 A (UNIV TEXAS) 28. April 1994 (1994-04-28) Ansprüche 1,2; Abbildung 1</p>	1
A	<p>EP 0 608 987 A (BECTON DICKINSON CO) 3. August 1994 (1994-08-03) das ganze Dokument</p>	1
	--- -/--	

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>R. CICCOCIOPPPO ET AL.: "Detection of the receptor for the human urokinase-type plasminogen activator using fluoresceinated uPA"</p> <p>JOURNAL OF HISTOCHEMISTRY AND CYTOCHEMISTRY, Bd. 45, Nr. 9, September 1997 (1997-09), Seiten 1307-1313, XP002117250 Baltimore, MD, VSA in der Anmeldung erwähnt Abbildungen 1,2</p> <p>---</p>	1,5
A	<p>US 5 519 120 A (DANO KELD ET AL) 21. Mai 1996 (1996-05-21) Anspruch 1</p> <p>-----</p>	1,5,14

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

EP 00/03347

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5234816	A	10-08-1993	NONE	
EP 0317156	A	24-05-1989	AT 81724 T	15-11-1992
			DE 3875456 A	26-11-1992
			DE 3875456 T	10-06-1998
			ES 2035317 T	16-03-1998
			GR 3006183 T	21-06-1993
			GR 3025901 T	30-04-1998
			JP 1161153 A	23-06-1989
			JP 1978940 C	17-10-1995
			JP 6105253 B	21-12-1994
			US 5137809 A	11-08-1992
WO 9409363	A	28-04-1994	US 5612185 A	18-03-1997
EP 0608987	A	03-08-1994	NONE	
US 5519120	A	21-05-1996	US 5891664 A	06-04-1999
			AU 652917 B	15-09-1994
			AU 5528090 A	05-11-1990
			AU 683951 B	27-11-1997
			AU 8046394 A	13-04-1995
			CA 2051676 A	08-10-1990
			WO 9012091 A	18-10-1990
			EP 1013285 A	28-06-2000
			EP 0467932 A	29-01-1992
			JP 4506148 T	29-10-1992

# VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESEN

Abse:der: MIT DER INTERNATIONALEN VORLÄUFIGEN  
PRÜFUNG BEAUFTRAGTE BEHÖRDE

12. JUN 2001  
Fdr:  
Patentanwalt  
PCT

An:

WEICKMANN WEICKMANN HUBER LISKA  
PRECHTEL BÖHM WEISS TIESMEYER  
HERZOG RUTTENSBERGER JORDAN  
Kopernikusstrasse 9  
D-81679 München  
ALLEMAGNE

*WW*

MITTEILUNG ÜBER DIE ÜBERSENDUNG  
DES INTERNATIONALEN VORLÄUFIGEN  
PRÜFUNGSBERICHTS  
(Regel 71.1 PCT)

Absendedatum  
(Tag/Monat/Jahr) 08.06.2001

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts  
19116P WO

## WICHTIGE MITTEILUNG

Internationales Aktenzeichen  
PCT/EP00/03347

Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr)  
13/04/2000

Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr)  
13/04/1999

Anmelder

WILEX BIOTECHNOLOGY GMBH et al.

1. Dem Anmelder wird mitgeteilt, daß ihm die mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde hiermit den zu der internationalen Anmeldung erstellten internationalen vorläufigen Prüfungsbericht, gegebenenfalls mit den dazugehörigen Anlagen, übermittelt.
2. Eine Kopie des Berichts wird - gegebenenfalls mit den dazugehörigen Anlagen - dem Internationalen Büro zur Weiterleitung an alle ausgewählten Ämter übermittelt.
3. Auf Wunsch eines ausgewählten Amtes wird das Internationale Büro eine Übersetzung des Berichts (jedoch nicht der Anlagen) ins Englische anfertigen und diesem Amt übermitteln.

## 4. ERINNERUNG

Zum Eintritt in die nationale Phase hat der Anmelder vor jedem ausgewählten Amt innerhalb von 30 Monaten ab dem Prioritätsdatum (oder in manchen Ämtern noch später) bestimmte Handlungen (Einreichung von Übersetzungen und Entrichtung nationaler Gebühren) vorzunehmen (Artikel 39 (1)) (siehe auch die durch das Internationale Büro im Formblatt PCT/IB/301 übermittelte Information).

Ist einem ausgewählten Amt eine Übersetzung der internationalen Anmeldung zu übermitteln, so muß diese Übersetzung auch Übersetzungen aller Anlagen zum internationalen vorläufigen Prüfungsbericht enthalten. Es ist Aufgabe des Anmelders, solche Übersetzungen anzufertigen und den betroffenen ausgewählten Ämtern direkt zuzuleiten.

Weitere Einzelheiten zu den maßgebenden Fristen und Erfordernissen der ausgewählten Ämter sind Band II des PCT-Leitfadens für Anmelder zu entnehmen.

Name und Postanschrift der mit der internationalen Prüfung beauftragten Behörde



Europäisches Patentamt  
D-80298 München  
Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d  
Fax: +49 89 2399 - 4465

Bevollmächtigter Bediensteter

SIEDSMA, Y

Tel. +49 89 2399-8167



# VERTRAG ÜBER INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

## PCT

### INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT



(Artikel 36 und Regel 70 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts 19116P WO	<b>WEITERES VORGEHEN</b> siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsberichts (Formblatt PCT/IPEA/416)	
Internationales Aktenzeichen PCT/EP00/03347	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 13/04/2000	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 13/04/1999
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK G01N33/574		
Anmelder WILEX BIOTECHNOLOGY GMBH et al.		

1. Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.
2. Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 8 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.
- ☒ Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).
- Diese Anlagen umfassen insgesamt 5 Blätter.

3. Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:

- I ☒ Grundlage des Berichts
- II ☐ Priorität
- III ☐ Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
- IV ☒ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
- V ☒ Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
- VI ☐ Bestimmte angeführte Unterlagen
- VII ☒ Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
- VIII ☒ Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Datum der Einreichung des Antrags  20/09/2000	Datum der Fertigstellung dieses Berichts  08.06.2001
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde:   Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Bevollmächtigter Bediensteter  Vanmontfort, D  Tel. Nr. +49 89 2399 8457 

**I. . Grundlage des Berichts**

1. Hinsichtlich der **Bestandteile** der internationalen Anmeldung (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigelegt, weil sie keine Änderungen enthalten (Regeln 70.16 und 70.17)*):  
**Beschreibung, Seiten:**

1-21                      ursprüngliche Fassung

**Patentansprüche, Nr.:**

1-23                      eingegangen am                      23/05/2001    mit Schreiben vom                      23/05/2001

**Zeichnungen, Blätter:**

1/12-12/12                      ursprüngliche Fassung

**Sequenzprotokoll in der Beschreibung, Seiten:**

1-4, in der ursprünglich eingereichten Fassung.

2. Hinsichtlich der **Sprache**: Alle vorstehend genannten Bestandteile standen der Behörde in der Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht worden ist, zur Verfügung oder wurden in dieser eingereicht, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

Die Bestandteile standen der Behörde in der Sprache: zur Verfügung bzw. wurden in dieser Sprache eingereicht; dabei handelt es sich um

- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen Recherche eingereicht worden ist (nach Regel 23.1(b)).
- ☐ die Veröffentlichungssprache der internationalen Anmeldung (nach Regel 48.3(b)).
- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen vorläufigen Prüfung eingereicht worden ist (nach Regel 55.2 und/oder 55.3).

3. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale vorläufige Prüfung auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das:

- ☒ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.
- ☒ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.
- ☐ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfassten Informationen dem schriftlichen

Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

4. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

- ☐ Beschreibung,      Seiten:
- ☐ Ansprüche,      Nr.:
- ☐ Zeichnungen,      Blatt:

5. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)).

*(Auf Ersatzblätter, die solche Änderungen enthalten, ist unter Punkt 1 hinzuweisen; sie sind diesem Bericht beizufügen).*

6. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

#### **IV. Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung**

1. Auf die Aufforderung zur Einschränkung der Ansprüche oder zur Zahlung zusätzlicher Gebühren hat der Anmelder:

- ☐ die Ansprüche eingeschränkt.
- ☒ zusätzliche Gebühren entrichtet.
- ☐ zusätzliche Gebühren unter Widerspruch entrichtet.
- ☐ weder die Ansprüche eingeschränkt noch zusätzliche Gebühren entrichtet.

2. ☐ Die Behörde hat festgestellt, daß das Erfordernis der Einheitlichkeit der Erfindung nicht erfüllt ist, und hat gemäß Regel 68.1 beschlossen, den Anmelder nicht zur Einschränkung der Ansprüche oder zur Zahlung zusätzlicher Gebühren aufzufordern.

3. Die Behörde ist der Auffassung, daß das Erfordernis der Einheitlichkeit der Erfindung nach den Regeln 13.1, 13.2 und 13.3

- ☐ erfüllt ist
- ☒ aus folgenden Gründen nicht erfüllt ist:  
**siehe Beiblatt**

4. Daher wurde zur Erstellung dieses Berichts eine internationale vorläufige Prüfung für folgende Teile der internationalen Anmeldung durchgeführt:

- ☒ alle Teile.
- ☐ die Teile, die sich auf die Ansprüche Nr. beziehen.



**V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung**

**1. Feststellung**

Neuheit (N)	Ja: Ansprüche	1-12, 15, 17, 19-23
	Nein: Ansprüche	13, 14, 16, 18
Erfinderische Tätigkeit (ET)	Ja: Ansprüche	1-10, 17, 19-23
	Nein: Ansprüche	11-16, 18
Gewerbliche Anwendbarkeit (GA)	Ja: Ansprüche	1-23
	Nein: Ansprüche	

**2. Unterlagen und Erklärungen  
siehe Beiblatt**

**VII. Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung**

Es wurde festgestellt, daß die internationale Anmeldung nach Form oder Inhalt folgende Mängel aufweist:  
**siehe Beiblatt**

**VIII. Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung**

Zur Klarheit der Patentansprüche, der Beschreibung und der Zeichnungen oder zu der Frage, ob die Ansprüche in vollem Umfang durch die Beschreibung gestützt werden, ist folgendes zu bemerken:  
**siehe Beiblatt**

**Zu Punkt IV**

Die Prüfungsabteilung schließt sich dem von der Recherchenabteilung wegen mangelnder Einheitlichkeit vorgebrachten Einwand an (Regel 13.1 PCT).

Die verschiedenen Erfindungen sind:

1. Ansprüche 1-12, 17

Verfahren zum Nachweis von Zellen in einer biologischen Probe unter Verwendung von zwei verschiedenen, die nachzuweisenden Zellen erkennenden Bindemolekülen, wobei die Bindemoleküle mit jeweils verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert werden.

2. Ansprüche 13-16, 18-23

Antikörper oder dessen Fragment, der gegen das Epitop 52-60 des Urokinaserezeptors (uPAR) gerichtet ist.

**Zu Punkt V**

Es wird auf die folgenden Dokumente verwiesen:

- D1 XUE et al., CANCER RESEARCH, Bd. 57, Nr. 9, 1. Mai 1997, Seiten 1682-1689
- D2 EP 0 317 156 A (BECTON DICKINSON CO) 24. Mai 1989
- D3 LUTHER et al., AMERICAN JOURNAL OF PATHOLOGY, Bd. 150, Nr. 4, April 1997, Seiten 1231-1244
- D4 ALLGAYER et al., JOURNAL OF HISTOCHEMISTRY AND CYTOCHEMISTRY, Bd. 45, Nr. 2, Februar 1997, Seiten 203-212
- D5 HEISS et al., NATURE MEDICINE, Bd. 1, Nr. 10, Oktober 1995 (1995-10), Seiten 1035-1039

## 1. Erfindung 1: Ansprüche 1-12, 17

- 1.1 Der Gegenstand der Ansprüche 1-10 und 17 ist neu und beruht auf einer erfinderischen Tätigkeit (Artikel 33(2) and 33(3) PCT).

D4 (Zusammenfassung) und D5 (Seite 1039, Spalte 1, Zeilen 18-39), die als nächstliegender Stand der Technik angesehen werden, offenbaren ein Verfahren zum Nachweis von seltenen Tumorzellen in Knochenmark über eine Doppelmarkierungsmethode unter Verwendung von einem ersten Cytokeratin-spezifischen Bindemolekül und einem zweiten Urokinaserezeptor-spezifischen Bindemolekül. Der Gegenstand des Anspruchs 1 unterscheidet sich dadurch daß der Nachweis unter Verwendung einer Doppelfluoreszenzmethode durchgeführt wird. Die mit der vorliegenden Erfindung zu lösende Aufgabe kann somit darin gesehen werden ein einfaches und gleichzeitig sensitives Verfahren zum quantitativen Nachweis seltener Tumorzellen in einer biologischen Probe bereitzustellen.

D1 (Seite 1683, Spalte 1, Absätze "Indirect Immunofluorescence Staining for Microscopy" und "Fluorescence Microscopy and Data Quantitation") offenbart ein Doppelfluoreszenz-Verfahren zum Nachweis von Tumorzellen **in einer vollständig aus Tumorzellen bestehende Probe**. Der Fachmann würde D1 nicht in Betracht ziehen weil es nicht bekannt ist daß beim Nachweis von derart **seltene Zellen** eine Doppelfluoreszenzmarkierung ausreichend sensitiv ist für einen quantitativen Nachweis.

D2 (Spalte 2 Zeile 40-Spalte 3 Zeile 20, Spalte 4 Zeilen 17-18) beschreibt den Nachweis unter Verwendung eines Doppelfluoreszenzprotokolls von weißen Blutzellen aus Knochenmark- und Blutproben. Es werden jedoch andere Zellen unter Verwendung anderer Marker nachgewiesen. Deshalb würde der Fachmann D2 nicht in Betracht ziehen.

Aus diesem Grund beruht der Gegenstand des Anspruchs 1 auf einer erfinderischen Tätigkeit. Dasselbe trifft für Ansprüche 2-10 und 17 zu.

- 1.2 Der Gegenstand der Ansprüche 11 beruht nicht auf einer erfinderischen Tätigkeit (Artikel 33(3) PCT).

D1 (Seite 1683, Spalte 1, Absätze "Indirect Immunofluorescence Staining for Microscopy" und "Fluorescence Microscopy and Data Quantitation") beschreibt ein Verfahren zur Markierung von Tumorzellen unter Verwendung eines

Doppelfluoreszenzprotokolls und wobei eines der Bindemoleküle für den Urokinase-Rezeptor spezifisch ist. D1 erwähnt auch ein Mittel (3% Paraformaldehyd) zur Fixierung von Zellen auf einer Festphase.

Es ist naheliegend für den Fachmann die Reagenzien eines Verfahrens in Form eines Reagenzienkit zu Verfügung zu stellen. Dem Gegenstand des Anspruchs 11 liegt daher keine erfinderische Tätigkeit zugrunde. Dasselbe trifft für Anspruch 12 zu.

## **2. Erfindung 2: Ansprüche 13-16, 18-23**

2.1 Der Gegenstand der Ansprüche 13, 14, 16 und 18 ist nicht neu (Artikel 33(2) PCT).

D3 (Zusammenfassung; Seite 1232, Spalte 2, Zeilen 7-10; Seite 1233, Spalte 2, Absatz "ELISA"; Seite 1241, Spalte 2, Zeilen 14-47) offenbart Antikörper MAb IIIF10, der gegen das Epitop 52-60 des uPAR gerichtet ist und die Verwendung dieses Antikörper als diagnostisches Mittel (zur Prognose der Verlaufs bei malignen Erkrankungen und zum Nachweis von Tumorzellen in einer biologischen Probe) oder als therapeutisches Mittel zur Funktionsblockierung bei Tumorzellen. Daher steht D3 dem Gegenstand der Ansprüche 13, 14, 16 und 18 neuheitsschädlich entgegen.

2.2 Der Gegenstand des Anspruchs 15 beruht nicht auf einer erfinderischen Tätigkeit (Artikel 33(3) PCT).

D4 (Zusammenfassung), das als nächstliegender Stand der Technik angesehen wird, offenbart die Verwendung eines Antikörpers, der gegen uPAR gerichtet ist, als diagnostisches Mittel zum Nachweis von Tumorzellen in Knochenmark. Der Gegenstand des Anspruchs 15 unterscheidet sich dadurch daß man ein Urokinaserezeptor-spezifisches Antikörper, der gegen das Epitope 52-60 des Urokinaserezeptors gerichtet ist, verwendet.

Der Antikörper MAb IIIF10, der gegen das Epitop 52-60 des uPAR gerichtet ist, wurde jedoch schon für denselben Zweck benutzt in D3 (Zusammenfassung; Seite 1232, Spalte 2, Zeilen 7-10). Der Fachmann würde D3 in Betracht ziehen. Aus diesem Grund beruht der Gegenstand des Anspruchs 15 nicht auf einer erfinderischen Tätigkeit.

2.3 Der Gegenstand der Ansprüche 19-23 ist neu und beruht auf einer erfinderischen Tätigkeit (Artikel 33(2) und 33(3) PCT) weil derartige rekombinanten Nukleinsäuren (Anspruch 19) und rekombinantes Polypeptide (Anspruch 20-23) mit Antikörpereigenschaften im Stand der Technik weder offenbart noch nahegelegt werden.

#### **Zu Punkt VII**

Im Widerspruch zu den Erfordernissen der Regel 5.1 a) ii) PCT werden in der Beschreibung weder der in dem Dokument D1 offenbarte einschlägige Stand der Technik noch dieses Dokument angegeben.

#### **Zu Punkt VIII**

Der in dem Anspruch 13 benutzte Ausdruck "**Mikrometasen**" ist vage und unklar und läßt den Leser über die Bedeutung des betreffenden technischen Merkmals im Ungewissen. Dies hat zur Folge, daß die Definition des Gegenstands dieses Anspruchs nicht klar ist (Artikel 6 PCT).

23. Mai 2001

- 1 -

### **Ansprüche**

1. Verfahren zum quantitativen Nachweis von epithelialen Tumorzellen in einer biologischen Probe, wobei die biologische Probe die nachzuweisenden Zellen im Bereich von  $1:10^4$  bis  $1:10^7$  der gesamten in der Probe vorhandenen Zellen enthält, umfassend die Schritte:
  - (a) Bereitstellen einer zu testenden Probe,
  - (b) Inkontaktbringen der Probe mit mindestens zwei verschiedenen, die nachzuweisenden Zellen erkennenden Bindemolekülen, wobei die Bindemoleküle mit jeweils verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert werden, wobei eines der Bindemoleküle für den Urokinase-Rezeptor spezifisch ist, und
  - (c) Bestimmen der Menge der Fluoreszenzmarkierungen in der auf einer Festphase fixierten Probe.
2. Verfahren nach Anspruch 1,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
daß der Nachweis in einer Knochenmarksprobe erfolgt.
3. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 2,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
daß man als zellspezifische Bindemoleküle Antikörper oder Antikörperfragmente oder/und Rezeptorliganden verwendet.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 2 bis 3,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
daß man ein zweites Cytokeratin-spezifisches Bindemolekül verwendet.

- 2 -

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
daß die Bindemoleküle indirekt markiert werden.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
daß die Bindemoleküle direkt markiert werden.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
daß die quantitative Auswertung der Probe durch ein konfokales Laser-Scanning-Mikroskop oder durch ein Fluoreszenzmikroskop erfolgt.
8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
daß die Auswertung der Probe durch parallele oder/und sequentielle Bestimmung der Fluoreszenz der verschiedenen Markierungsgruppen erfolgt.
9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, weiterhin umfassend eine Charakterisierung von durch Reaktion mit den Bindemolekülen identifizierten Zellen.
10. Verfahren nach Anspruch 9,  
**dadurch gekennzeichnet**  
daß die Charakterisierung eine ortsspezifische Bestimmung der Fluoreszenzmarkierung umfaßt.

- 3 -

11. Reagenzienkit zum quantitativen Nachweis von Zellen in einer biologischen Probe umfassend
  - (a) ein erstes, die nachzuweisenden Zellen erkennendes Bindemolekül und eine erste Fluoreszenz-Markierungsgruppe, wobei das Bindemolekül für den Urokinase-Rezeptor spezifisch ist,
  - (b) ein zweites, die nachzuweisenden Zellen erkennendes Bindemolekül und eine zweite Fluoreszenz-Markierungsgruppe, wobei das erste und das zweite Bindemolekül und die erste und die zweite Fluoreszenz-Markierungsgruppe verschieden sind und
  - (c) Mittel zur Fixierung von Zellen auf einer Festphase.
12. Verwendung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 10 oder des Reagenzienkits nach Anspruch 11 zum Nachweis von Mikrometasen in biologischen Proben.
13. Verwendung eines Antikörpers, der gegen das Epitop 52-60 des Urokinaserezeptors (uPAR) gerichtet ist, oder eines antigenbindenden Fragments davon zur Herstellung eines gegen uPAR auf Tumorzellen gerichteten diagnostischen Mittels zur Erstellung einer Prognose des Verlaufs bei malignen Erkrankungen.
14. Verwendung nach Anspruch 13 als diagnostisches Mittel zum Nachweis von Tumorzellen in einer biologischen Probe.
15. Verwendung nach Anspruch 14 zum Nachweis von verstreuten Tumorzellen in Knochenmark.
16. Verwendung nach einem der Ansprüche 14 bis 15 in einem ELISA.
17. Verwendung nach einem der Ansprüche 14 bis 15 in einem Doppel-fluoreszenz-Nachweisverfahren.



- 4 -

18. Verwendung nach einem der Ansprüche 13 bis 17,  
**dadurch g kennzeichnet,**  
daß der Antikörper ausgewählt wird aus dem monoklonalen Antikörper III F10, Fragmenten davon oder Antikörpern und Antikörperfragmenten mit äquivalenter Bindspezifität.
19. Rekombinante Nukleinsäure, die für ein Polypeptid mit Antikörpereigenschaften kodiert, umfassend
- (a) eine CDR3-VH-Sequenz kodierend für die Aminosäuresequenz  
(I):  
D G S M G G F D Y  
oder/und
- (b) eine CDR-3-VL-Sequenz kodierend für die Aminosäuresequenz  
(II):  
L Q H W N Y P Y T
20. Rekombinantes Polypeptid mit Antikörpereigenschaften umfassend:
- (a) eine CDR3-VH-Aminosäuresequenz (I):  
D G S M G G F D Y  
oder/und
- (b) eine CDR-3-VL-Aminosäuresequenz (II):  
L Q H W N Y P Y T
21. Rekombinantes Polypeptid nach Anspruch 20,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
daß es ein scFv-Antikörper-Fragment ist.
22. Rekombinantes Polypeptid nach Anspruch 20 oder 21,  
**dadurch g kennzeichnet,**  
daß es ein humanisiertes Antikörperfragment ist.

- 5 -

23. Rekombinantes Polypeptid nach einem der Ansprüche 20 bis 22,  
dadurch gekennz ichnet,  
daß es an eine Effektorgruppe gekoppelt ist.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/EP 00/03347

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC 7    G01N33/574    G01N33/577    G01N33/68    A61K39/395    A61K47/48 A61K51/10    C12N15/13    C07K16/28    C07K19/00		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7    G01N    C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) BIOSIS, EMBASE, CHEM ABS Data, WPI Data, PAJ, EPO-Internal, STRAND		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5 234 816 A (TERSTAPPEN LEON W M M) 10 August 1993 (1993-08-10)	1-4,6-13
Y	the whole document	1,5
X	W. XUE ET AL.: "Urokinase-type plasminogen activator receptors associate with betal and beta3 integrins of fibrosarcoma cells: dependence on extracellular matrix components" CANCER RESEARCH, vol. 57, no. 9, 1 May 1997 (1997-05-01), pages 1682-1689, XP002117246 Baltimore, MD, VSA	1-4,6-13
Y	abstract; figure 1	1,5
X	EP 0 317 156 A (BECTON DICKINSON CO) 24 May 1989 (1989-05-24) claims 1-10	1,3,4,6-13
-/-		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents : <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p>*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>*E* earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>*L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>*O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>*P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>*X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>*Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</p> <p>*G* document member of the same patent family</p> </div> </div>		
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report	
28 July 2000	18/08/2000	
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer  Nooij, F	

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/EP 00/03347

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	H. ALLGAYER ET AL.: "Immunocytochemical phenotyping of disseminated tumor cells in bone marrow by uPA receptor and CK18: investigation of sensitivity and specificity of an immunogold/alkaline phosphatase double staining protocol" JOURNAL OF HISTOCHEMISTRY AND CYTOCHEMISTRY, vol. 45, no. 2, February 1997 (1997-02), pages 203-212, XP002117247 Baltimore, MD, USA cited in the application abstract	1,5
Y	M. HEISS ET AL.: "Individual development and uPA-receptor expression of disseminated tumour cells in bone marrow: a reference to early systemic disease in solid cancer" NATURE MEDICINE, vol. 1, no. 10, October 1995 (1995-10), pages 1035-1039, XP002117248 New York, NY, USA cited in the application page 1039, column 1, line 18, paragraph 2 - line 39	1,5
A	I. FUNKE ET AL.: "Comparative analyses of bone marrow micrometastases in breast and gastric cancer" INTERNATIONAL JOURNAL OF CANCER, vol. 65, no. 6, 15 March 1996 (1996-03-15), pages 755-761, XP002117249 New York, NY, USA cited in the application abstract	1
A	WO 94 09363 A (UNIV TEXAS) 28 April 1994 (1994-04-28) claims 1,2; figure 1	1
A	EP 0 608 987 A (BECTON DICKINSON CO) 3 August 1994 (1994-08-03) the whole document	1
	-/--	

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Internat. Application No

PCT/EP 00/03347

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5234816	A	10-08-1993	NONE	
EP 0317156	A	24-05-1989	AT 81724 T	15-11-1992
			DE 3875456 A	26-11-1992
			DE 3875456 T	10-06-1998
			ES 2035317 T	16-03-1998
			GR 3006183 T	21-06-1993
			GR 3025901 T	30-04-1998
			JP 1161153 A	23-06-1989
			JP 1978940 C	17-10-1995
			JP 6105253 B	21-12-1994
			US 5137809 A	11-08-1992
WO 9409363	A	28-04-1994	US 5612185 A	18-03-1997
EP 0608987	A	03-08-1994	NONE	
US 5519120	A	21-05-1996	US 5891664 A	06-04-1999
			AU 652917 B	15-09-1994
			AU 5528090 A	05-11-1990
			AU 683951 B	27-11-1997
			AU 8046394 A	13-04-1995
			CA 2051676 A	08-10-1990
			WO 9012091 A	18-10-1990
			EP 1013285 A	28-06-2000
			EP 0467932 A	29-01-1992
			JP 4506148 T	29-10-1992

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/03347

## A. KLASSTIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 G01N33/574 G01N33/577 G01N33/68 A61K39/395 A61K47/48  
A61K51/10 C12N15/13 C07K16/28 C07K19/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 G01N C07K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

BIOSIS, EMBASE, CHEM ABS Data, WPI Data, PAJ, EPO-Internal, STRAND

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	US 5 234 816 A (TERSTAPPEN LEON W M M) 10. August 1993 (1993-08-10)	1-4,6-13
Y	das ganze Dokument	1,5
X	W. XUE ET AL.: "Urokinase-type plasminogen activator receptors associate with betal and beta3 integrins of fibrosarcoma cells: dependence on extracellular matrix components" CANCER RESEARCH, Bd. 57, Nr. 9, 1. Mai 1997 (1997-05-01), Seiten 1682-1689, XP002117246 Baltimore, MD, VSA	1-4,6-13
Y	Zusammenfassung; Abbildung 1	1,5
X	EP 0 317 156 A (BECTON DICKINSON CO) 24. Mai 1989 (1989-05-24) Ansprüche 1-10	1,3,4,6-13
	--- -/-	



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

28. Juli 2000

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

18/08/2000

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Nooij, F

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/03347

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	H. ALLGAYER ET AL.: "Immunocytochemical phenotyping of disseminated tumor cells in bone marrow by uPA receptor and CK18: investigation of sensitivity and specificity of an immunogold/alkaline phosphatase double staining protocol" JOURNAL OF HISTOCHEMISTRY AND CYTOCHEMISTRY, Bd. 45, Nr. 2, Februar 1997 (1997-02), Seiten 203-212, XP002117247 Baltimore, MD, VSA in der Anmeldung erwähnt Zusammenfassung	1,5
Y	M. HEISS ET AL.: "Individual development and uPA-receptor expression of disseminated tumour cells in bone marrow: a reference to early systemic disease in solid cancer" NATURE MEDICINE, Bd. 1, Nr. 10, Oktober 1995 (1995-10), Seiten 1035-1039, XP002117248 New York, NY, VSA in der Anmeldung erwähnt Seite 1039, Spalte 1, Zeile 18, Absatz 2 - Zeile 39	1,5
A	I. FUNKE ET AL.: "Comparative analyses of bone marrow micrometastases in breast and gastric cancer" INTERNATIONAL JOURNAL OF CANCER, Bd. 65, Nr. 6, 15. März 1996 (1996-03-15), Seiten 755-761, XP002117249 New York, NY, VSA in der Anmeldung erwähnt Zusammenfassung	1
A	WO 94 09363 A (UNIV TEXAS) 28. April 1994 (1994-04-28) Ansprüche 1,2; Abbildung 1	1
A	EP 0 608 987 A (BECTON DICKINSON CO) 3. August 1994 (1994-08-03) das ganze Dokument	1
	-/--	

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Intern: des Aktenzeichens

PCT/EP 00/03347

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
US 5234816	A	10-08-1993	KEINE		
EP 0317156	A	24-05-1989	AT	81724 T	15-11-1992
			DE	3875456 A	26-11-1992
			DE	3875456 T	10-06-1998
			ES	2035317 T	16-03-1998
			GR	3006183 T	21-06-1993
			GR	3025901 T	30-04-1998
			JP	1161153 A	23-06-1989
			JP	1978940 C	17-10-1995
			JP	6105253 B	21-12-1994
			US	5137809 A	11-08-1992
WO 9409363	A	28-04-1994	US	5612185 A	18-03-1997
EP 0608987	A	03-08-1994	KEINE		
US 5519120	A	21-05-1996	US	5891664 A	06-04-1999
			AU	652917 B	15-09-1994
			AU	5528090 A	05-11-1990
			AU	683951 B	27-11-1997
			AU	8046394 A	13-04-1995
			CA	2051676 A	08-10-1990
			WO	9012091 A	18-10-1990
			EP	1013285 A	28-06-2000
			EP	0467932 A	29-01-1992
			JP	4506148 T	29-10-1992



**VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT  
IM GEBIET DES PATENTWESSENS**

**PCT**

**INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT**

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

<b>Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts</b> <b>19116P WO</b>	<b>WEITERES VORGEHEN</b> siehe Mitteilung über die Übermittlung des internationalen Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5	
<b>Internationales Aktenzeichen</b> <b>PCT/EP 00/ 03347</b>	<b>Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr)</b> <b>13/04/2000</b>	<b>(Frühestes) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr)</b> <b>13/04/1999</b>
<b>Anmelder</b>  <b>WILEX BIOTECHNOLOGY GMBH</b>		

Dieser internationale Recherchenbericht wurde von der Internationalen Recherchenbehörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem Internationalen Büro übermittelt.

Dieser internationale Recherchenbericht umfaßt insgesamt 7 Blätter.

☒ Darüber hinaus liegt ihm jeweils eine Kopie der in diesem Bericht genannten Unterlagen zum Stand der Technik bei.

**1. Grundlage des Berichts**

- a. Hinsichtlich der **Sprache** ist die internationale Recherche auf der Grundlage der internationalen Anmeldung in der Sprache durchgeführt worden, in der sie eingereicht wurde, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

☐ Die internationale Recherche ist auf der Grundlage einer bei der Behörde eingereichten Übersetzung der internationalen Anmeldung (Regel 23.1 b)) durchgeführt worden.

- b. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale Recherche auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das

☒ in der internationalen Anmeldung in Schriftlicher Form enthalten ist.

☒ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.

☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

☐ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.

☐ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfaßten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

2. ☐ Bestimmte Ansprüche haben sich als nicht recherchierbar erwiesen (siehe Feld I).

3. ☒ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung (siehe Feld II).

**4. Hinsichtlich der Bezeichnung der Erfindung**

☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

☐ wurde der Wortlaut von der Behörde wie folgt festgesetzt:

**5. Hinsichtlich der Zusammenfassung**

☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

☐ wurde der Wortlaut nach Regel 38.2b) in der in Feld III angegebenen Fassung von der Behörde festgesetzt. Der Anmelder kann der Behörde innerhalb eines Monats nach dem Datum der Absendung dieses internationalen Recherchenberichts eine Stellungnahme vorlegen.

6. Folgende Abbildung der Zeichnungen ist mit der Zusammenfassung zu veröffentlichen: Abb. Nr. \_\_\_\_\_

☐ wie vom Anmelder vorgeschlagen

☐ weil der Anmelder selbst keine Abbildung vorgeschlagen hat.

☐ weil diese Abbildung die Erfindung besser kennzeichnet.

☒ keine der Abb.